



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

LEONARDO AUGUSTO RÊGO DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITOS DE
FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA *Amansia*
multifida NA COAGULAÇÃO, INFLAMAÇÃO, RADICAIS
LIVRES E VIABILIDADE CELULAR.**

**NATAL
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LEONARDO AUGUSTO RÊGO DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITOS DE
FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA *Amansia*
multifida NA COAGULAÇÃO, INFLAMAÇÃO, RADICAIS
LIVRES E VIABILIDADE CELULAR.**

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: Edda Lisboa Leite

**NATAL
2010**

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

Souza, Leonardo Augusto Rêgo de.

Caracterização físico-química e efeitos de frações polissacarídicas da alga *Amansia multifida* na coagulação, inflamação, radicais livres e viabilidade celular / Leonardo Augusto Rêgo de Souza. - Natal, RN, 2010.

123 f. : Il.

Orientador: Edda Lisboa Leite.

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

1. Polissacarídeos – Dissertação. 2. Alga Marinha – Dissertação. 3. Radicais Livres – Dissertação. I. Leite, Edda Lisboa. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 547.458

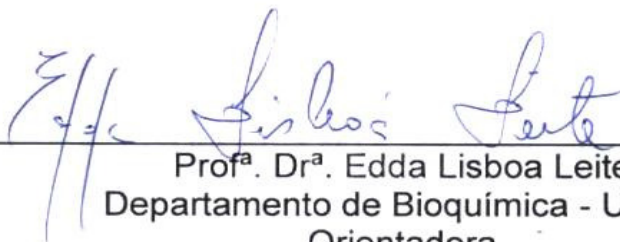
LEONARDO AUGUSTO RÊGO DE SOUZA


**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E EFEITOS DE FRAÇÕES
POLISSACARÍDICAS DA ALGA *Amansia multifida* NA COAGULAÇÃO,
INFLAMAÇÃO, RADICAIS LIVRES E VIABILIDADE CELULAR.**


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: 17/09/2010

BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dr^a. Edda Lisboa Leite
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientadora


Prof^a. Dr^a. Rosélia de Sousa Leal
Departamento de Ciências Biológicas- UNP
1º Examinador


Prof^a. Dr^a. Aurigena Antunes de Araújo Ferreira
Departamento de Biofísica e Farmacologia – UFRN
2º Examinador

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as chances oferecidas, e por mais esta vitória, a primeira de uma série que ainda almejo alcançar.

Ao meu pai Wilton Batista de Souza e mãe Maria de Fátima Rego, pela minha vida, pelo apoio e por todos os ensinamentos, meus primeiros e eternos mestres.

Aos meus irmãos Leidezângela, Leticia e Leandro, amigos antes de tudo que muito fizeram falta em todos estes anos afastados de sua convivência. A meus sobrinhos Heitor e Luiz Felipe.

A todos familiares, em especial a José Rego, que com ajuda dele meu sonho se tornou possível. Muito Obrigado!

À professora Edda, por todo seu apoio, disposição e ensinamentos. Foi muito mais que uma orientadora. Quem não gostaria de ter um orientador igual a ela?

A todos os colegas do laboratório: Celina, Marília, Monique, Allisson, Almino, Adriane (Boca), Thuane, Thiago, Kahena e Sinara. Em especial a Luíza e Juliana, que por muitas vezes contribuíram de forma direta para concretização desse trabalho. Obrigado a todos.

À Tarciana Gurgel, pessoa responsável por toda desenvoltura que adquiri dentro do laboratório.

Aos colegas da turma 2009 e 2010, pelos bons momentos de convívio ao longo desse 1 ano e meio, em especial a Roberta e Larissa.

Aos demais amigos do departamento, em especial a Carol.

Aos professores Selma, Maurício (*in memoriam*), Suely, Elizeu, Dilma e Luiz, Fátima Vitória e Maria Tereza Barreto, por todo conhecimento transmitido, contribuindo direto ou indiretamente para realização desse trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRN, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, em especial a Margarita por sempre está disposta a tirar minhas dúvidas burocráticas diárias.

À Cristiane (Dep. Química) por toda sua disposição e interesse em me ajudar.

Aos professores Jacira, Telma e Renata pelas contribuições dadas a esse trabalho durante a qualificação. Muito obrigado!

Aos meus grandes amigos: Bruno, Roberta, Lisiane, Luiz, Aline Penélope, Arthur, Leonardo, Júnior, Josinha e tantos outros por toda amizade e força a mim dada durante essa caminhada.

Aos professores Rosélia, Aurigena e Luciana da Matta por term aceito compor a banca de defesa.

Aos funcionários do Dep. de Bioquímica, em especial a Jonas e Ângela.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

“As pessoas que vencem nesse mundo são aquelas que se levantam e procuram o que querem, e que, se não o encontram, fazem-no.”

Bernard Shaw

RESUMO

Galactanas são polissacarídeos sulfatados presentes na parede celular de algas vermelhas. Carragenanas são galactanas bem conhecidas na indústria de alimentos como polissacarídeos gelificantes e para induzir o processo inflamatório em roedores como modelo animal. A extração de polissacarídeos de *A. multifida* foi realizada por proteólise e precipitação em diferentes volumes de acetona, que produziu três frações (F1, F2, e FT). Análises físicas e químicas revelaram que essas frações são predominantemente galactanas sulfatados. Resultados dos ensaios de atividade antioxidante mostraram que todas essas frações apresentam atividade antioxidante e que esteve associada ao teor de sulfato na análise da redução da potência e capacidade antioxidante total. No entanto, estas frações não foram eficazes contra a peroxidação lipídica. A fração FT apresentou maior atividade no teste de APTT a 200 mg (> 240 s). A avaliação da atividade hemolítica mostrou que a fração FT tem a melhor atividade, aumentando a lise pelo sistema complemento para 42,3% (50 mg) ($p < 0,001$). A fração FT apresentou o melhor rendimento, atividade anticoagulante e hemolítica entre as três frações e por isso foi escolhido para os estudos *in vivo*. A avaliação da inflamação com a fração FT (50 mg / kg MB) mostrou que a migração celular e a produção de IL-6 aumentaram 670,1% ($p < 0,001$) e 531,8% ($p < 0,001$), respectivamente. Estes resultados confirmam a sua utilização como indutor de inflamação em modelo animal. Resultados do teste de citotoxicidade mostraram que todas as frações têm efeitos tóxicos nas células 3T3 e HeLa após a exposição de 48 horas, exceto quando 100 mg para os F1 e FT foram utilizados. Estes resultados levantam a discussão se estes polissacarídeos devem ser usados como aditivo em alimentos, cosméticos e medicamentos.

Palavras-chave: Alga marinha, *Amansia multifida*, carragenana, inflamação, coagulação, radicais livres.

ABSTRACT

Galactans are polysaccharides sulfated present in the cell wall of red algae. Carrageenans are galactans well known in the food industry as gelling polysaccharides and for induce inflammatory process in rodents as animal model. The extraction of polysaccharides from *A. multifida* has been carried out by proteolysis and precipitation in different volumes of acetone, which produced three fractions (F1, F2, and FT). Chemical and physical analyses revealed that these fractions are sulfated galactan predominantly. Results of the antioxidant activity assays showed that all of these fractions have antioxidant activity and that was associated with sulfate content of the analysis of reducing power and total antioxidant capacity. However, these fractions were not effective against lipid peroxidation. The fraction FT presented higher activity on the APTT test at 200 µg (> 240 s). The assessment of the hemolytic activity showed that the FT fraction has the best activity, increasing lyses by the complement system to 42.3% (50 µg) ($p < 0,001$). The fraction FT showed the best yield, anticoagulant and hemolytic activity between the three fractions and therefore it was choose for the *in vivo* studies. The Inflammation assessment using the FT fraction (50 mg / kg MB) showed that the cellular migration and the IL-6 production increased 670.1% ($p < 0,001$) and 531.8% ($p < 0,001$), respectively. These results confirmed its use as an inflammation inducer in animal model. Cytotoxicity assay results showed that all fractions have toxic effects on 3T3 and HeLa cells after exposition of 48 hours, except when 100 µg for both F1 and FT were used. These results arise the discussion whether these polysaccharides it should be used as additive in foods, cosmetics and medicines.

Key-words: Seaweed, *Amansia multifida*, carrageenan, inflammation, coagulation, free radicals.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura comum às clorofilas a, b e d.....	22
FIGURA 2	Estrutura química dos carboidratos comuns e específicos presentes em algas marinhas.....	24
FIGURA 3	Estrutura de carragenanas da família Kappa e Lambda com as suas respectivas substituições de radicais.....	26
FIGURA 4	Fontes intracelulares de EROs e principais mecanismos de defesa antioxidante.....	28
FIGURA 5	Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.....	31
FIGURA 6	Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular.....	35
FIGURA 7	Ação pleomórfica da IL-6 no organismo.....	37
FIGURA 8	Via clássica e alternativa do sistema complemento.....	39
FIGURA 9	Representação esquemática dos complexos procoagulantes.....	42
FIGURA 10	Representação molecular da ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados.....	43
FIGURA 11	Alga marinha <i>Amansia multifida</i>	46
FIGURA 12	Organograma geral das metodologias empregadas neste trabalho.....	50
FIGURA 13	Esquema de obtenção das frações polissacarídicas de <i>A. multifida</i>	52
FIGURA 14	Representação esquemática da geração do ânion radical	

	superóxido e ação de um antioxidante presente no meio.....	58
FIGURA 15	Via de formação do Malonilaldeído a partir do radical peroxil do ácido graxo triinsaturado.e formação do cromógeno TBA.....	61
FIGURA 16	Esquema da metodologia do ensaio de citotoxicidade por MTT, com a formação de formazam pelas células viáveis.....	65
FIGURA 17	Rendimento das frações polissacarídicas obtidas da alga vermelha <i>Amansia multifida</i>	66
FIGURA 18	Perfil eletroforético das frações polissacarídicas da alga <i>Amansia multifida</i>	67
FIGURA 19	Perfil de degradação termogravimétrico das três frações de <i>A. multifida</i> , utilizando atmosfera de ar.....	68
FIGURA 20	Teores de matéria orgânica e inorgânica das três frações de <i>A. multifida</i> analisadas por termogravimetria.....	68
FIGURA 21	Perfil de degradação termogravimétrico, analisado pela derivada da TG das três frações de <i>A. multifida</i> , utilizando atmosfera de ar.....	69
FIGURA 22	Análise térmica diferencial (DTA) das três frações de <i>A. multifida</i> , utilizando atmosfera de ar.....	71
FIGURA 23	Perfil de eluição das frações polissacarídicas alga <i>A. multifida</i> , quando submetida a cromatografia de exclusão molecular, utilizando coluna sephadex G-100.....	73
FIGURA 24	Perfil cromatográfico dos hidrolisados das frações polissacarídicas de <i>A. multifida</i> , utilizando o sistema de solvente, (A) Butanol: piridina:água (2:3:1,5 v/v) e (B) Butanol: ácido acético:água (3:1:1 v/v).....	74
FIGURA 25	Espectros do infravermelho (4000-600 cm^{-1}) das frações polissacarídicas da alga vermelha <i>A. multifida</i>	

		76
FIGURA 26	Espectros do infravermelho (1300 - 600 cm ⁻¹) das frações polissacarídicas da alga vermelha <i>A. multifida</i>	77
FIGURA 27	Perfil de poder redutor das frações polissacarídicas da alga <i>A. multifida</i> e de uma κ-carragenana comercial.....	80
FIGURA 28	Perfil de atividade antioxidante frações polissacarídicas da alga <i>A. multifida</i> , e de uma kappa carragenana comercial, avaliado pela inibição do radical superóxido.	82
FIGURA 29	Perfil de atividade antioxidante frações polissacarídicas da alga <i>A. multifida</i> , de uma kappa carragenana comercial e BHT, avaliado pela inibição do radical hidroxila.....	83
FIGURA 30	Perfil de quelação íon ferro (Fe ⁺²) pelas frações polissacarídicas da alga <i>A. multifida</i> , de uma kappa carragenana comercial e BHT.....	84
FIGURA 31	Perfil da peroxidação lipídica das frações polissacarídicas da alga <i>A. multifida</i> , κ-carragenana comercial e α-tocoferol.....	85
FIGURA 32	Efeito hemolítico das frações polissacarídicas F1 (A), F2 (B) e FT (C) de <i>A. multifida</i>	86
FIGURA 33	Contagem de leucócitos do lavado peritoneal após 3h de tratamento com salina (NaCl 0,9%), carragenana kappa (25 mg/kg de PC) e Fração FT (25 e 50mg/kg de PC) da alga <i>Amansia multifida</i>	87
FIGURA 34	Concentração de IL-6 do lavado peritoneal após 3h de tratamento com salina (NaCl 0,9%), carragenana kappa (25 mg/kg de PC) e Fração FT (25 e 50mg/kg de PC) da alga <i>Amansia multifida</i>	88
FIGURA 35	Efeito na viabilidade celular das frações polissacarídicas, F1 (A), F2 (B) e FT (C) da alga <i>A. multifida</i> no crescimento dos	

	fibroblastos 3T3, no período de 24 e 48h, avaliado pelo método de MTT.....	89
FIGURA 36	Efeito na viabilidade celular das frações polissacarídicas, F1 (A), F2 (B) e FT (C) da alga <i>A. multifida</i> no crescimento das células HeLa (câncer de colo uterino) no período de 24 e 48h, avaliado pelo método de MTT.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Fontes usuais de alguns polissacarídeos.....	25
TABELA 2	Eventos relacionados a espécies reativas de O ₂	30
TABELA 3	Análise térmica por termogravimetria das frações polissacarídicas de <i>A. multifida</i> , de acordo com a ordem de degradação, com aquecimento de 0 a 900 °C, vazão de 10 °C/min em atmosfera de oxigênio.....	70
TABELA 4	Percentual dos constituintes orgânicos (açúcares totais, compostos fenólicos, proteína) e cinzas (sulfatos, carbonatos, óxidos, cloretos, fosfatos, fluoretos) das frações polissacarídicas da alga vermelha <i>Amansia multifida</i> , calculado em relação ao peso.....	73
TABELA 5	Composição monossacarídica e razão molar (por densitometria) das frações polissacarídicas da alga vermelha <i>A. multifida</i>	75
TABELA 6	Comprimentos de ondas e seus respectivos grupos funcionais encontrados nas frações polissacarídicas da alga vermelha <i>A. multifida</i>	78
TABELA 7	Análise de atividade anticoagulante pelo teste de PT e APTT das frações polissacarídicas da alga vermelha <i>A. multifida</i> e heparina.....	79
TABELA 8	Capacidade antioxidante total das frações polissacarídicas da alga <i>A. multifida</i> , e de uma kappa carragenana comercial, <i>in vitro</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AL	L-anidrogactose
APTT	Tempo parcial de tromboplastina ativada
AT	Antitrombina
CLC	Citocina tipo cardiotrofina
cm	Centímetro
CNTF	Fator de crescimento neurotrófico
CS	Condroitin sulfato,
CT-1	Cardiotrofina 1
CTV	brometo de N-cetil-N-N-N-trimetilamônio
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DrTG	Derivada da termogravimetria
DS	Dermatan sulfato
DTA	Análise térmica diferencial
Epo	Eritropoietina
ERN	Espécie reativa do nitrogênio
ERO	Espécie reativa do oxigênio
F1	Fração 1
F2	Fração 2
FII	Protrombina
FIII	Fator antihemolítico
FIX	Fator cristmas
FT	Fator tecidual

FT	Fração total
FVII	Pró-convertina
FX	Fator Stuart
FXI	Fator antecedente de tromboplastina
FXII	Fator Hageman
G	Galactose
g	Gramas
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GH	Hormônio do crescime
h	Hora
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
HS	Heparan Sulfato
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-6	Interleucina 6
kDa	Quilodallton
Kg	Quilograma
LIF	Fator inibidor da leucemia
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPS	Lipopolissacarídeos
M	molar
MDA	Malonilaldeído

mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio
N	Normal
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio.
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	Azul de nitrotetrazólio
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
°C	Grau ceucius
OD	Desvio óptico
PDA	1,3 diaminopropano acetato
PL	Peroxidação lipídica
PMS	Fenazina metassulfato
PRL	Pro-lactina
PT	Tempo de protrombina
PyK2	Tirosina quinase rica em prolina
rpm	Rotação por minuto
SC	Sistema complemento
SOD	Superóxido desmutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Termogravimetria

TLR	Receptor toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
Tx.	Taxa
Vol.	Volume
Zn	Zinco
α	Alfa
β	Beta
θ	Theta
ι	Iota
κ	Kappa
λ	Lambda
ν	Nu
μ	Mu
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	22
1.1.	ALGAS.....	22
1.2.	POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS VERMELHAS.....	24
1.2.1.	Propriedades biológicas das carragenanas.....	26
1.3.	ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO.....	27
1.3.1.	Peroxidação lipídica.....	30
1.3.2.	Radical superóxido.....	31
1.3.3.	Peróxido de Hidrogênio.....	32
1.3.4.	Radical hidroxila.....	32
1.4.	INFLAMAÇÃO – ASPECTOS GERAIS.....	33
1.4.1.	Migração celular.....	35
1.4.2.	Citocinas.....	36
1.4.3.	Sistema complemento.....	37
1.5.	COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	40
1.5.1.	Agentes anticoagulantes.....	43
2.	OBJETIVOS.....	45
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1.	MATERIAIS.....	46
3.1.1.	Alga.....	46
3.1.2.	Animais.....	47
3.1.3.	Outros materiais.....	47
3.1.4.	Equipamentos.....	48
3.2.	MÉTODOS.....	50

3.2.1.	Organograma geral.....	51
3.2.2.	Extração e fracionamento dos polissacarídeos ácidos da alga <i>Amansia multifida</i>.....	51
3.2.2.1.	Coleta e obtenção do pó cetônico.....	51
3.2.2.2.	Proteólise e fracionamento.....	51
3.2.3.	Caracterização física e química.....	53
3.2.3.1.	Eletroforese em gel de agarose.....	53
3.2.3.2.	Análises térmicas.....	53
3.2.3.3.	Dosagens químicas.....	54
3.2.3.4.	Análise da massa molecular.....	55
3.2.3.5.	Composição monossacarídica.....	55
3.2.3.6.	Espectroscopia do infravermelho.....	55
3.2.4.	Atividades biológicas.....	55
3.2.4.1.	Atividade antiocoagulante	55
3.2.4.1.1.	Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT).....	56
3.2.4.1.2.	Tempo de protrombina (PT).....	56
3.2.4.2.	Atividade antioxidante	56
3.2.4.2.1.	Poder redutor.....	56
3.2.4.2.2.	Atividade antioxidante total.....	57
3.2.4.1.3.	Inibição do radical superóxido.....	57
3.2.4.2.4.	Inibição do radical hidroxila.....	58
3.2.4.2.5.	Ação quelante de ferro.....	59
3.2.4.2.6.	Ação na peroxidação lipídica.....	59
3.2.4.3.	Atividade inflamatória via hemólise	61
3.2.4.3.1.	Hemólise direta.....	61

3.2.4.3.2.	Hemólise pela via alternativa do sistema complemento.....	62
3.2.4.4.	Peritonite aguda em camundongos.....	63
3.2.4.4.1.	Dosagem de interleucina 6 (IL-6).....	64
3.2.5.	Avaliação da citotoxicidade	64
3.2.7.	Análise estatística.....	65
4.	RESULTADOS.....	66
4.1.	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS.....	66
4.2.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA.....	66
4.2.1.	Eletroforese em gel de agarose.....	66
4.2.2.	Análises térmicas.....	67
4.2.3.	Dosagens químicas.....	71
4.2.4.	Análise da massa molecular.....	72
4.2.5.	Composição monossacarídica por cromatografia descendente em papel (CDP).....	74
4.2.6.	Espectroscopia do infravermelho.....	75
4.3.	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	78
4.3.1.	Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas da alga <i>A. multifida</i>.....	78
4.3.2.	Atividade antioxidante das frações polissacarídicas da alga <i>A. multifida</i>.....	79
4.3.2.1.	Análise do poder redutor.....	79
4.3.2.2.	Capacidade Antioxidante Total.....	80
4.3.2.3.	Inibição do radical superóxido.....	81
4.3.2.4.	Inibição do radical hidroxila.....	82
4.3.2.5.	Ação quelante de ferro.....	83
4.3.2.6.	Ação na peroxidação lipídica.....	84

4.2.3.	Atividade inflamatória das frações polissacarídicas da alga	85
	<i>A. multifida.</i>	
4.2.3.1.	Atividade hemolítica direta.....	85
4.2.3.2.	Atividade hemolítica via sistema complemento.....	85
4.2.3.3.	Peritonite aguda em camundongos da fração FT.....	87
4.2.4.	Efeito na viabilidade celular das frações polissacarídicas	89
	da alga <i>A. multifida.</i>	
5.	DISCUSSÃO.....	92
6.	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101
	ANEXO.....	119

1. INTRODUÇÃO

1.1. Algas

As algas marinhas são organismos considerados geralmente como vegetais inferiores, principalmente, por apresentarem uma menor diferenciação celular em relação aos vegetais terrestres, considerados superiores. As algas ducícolas, apresentam estruturas mais elaboradas, devido a viverem em ambiente aquático e com ele interagirem estreitamente, não estando expostas parcialmente ao ar e ao solo, como as plantas terrestres (SILVA, 1999).

As algas não apresentam sistema vascular, entretanto, suas células podem formar aglomerações, na forma de fios ou de lâminas finas (MATIAS, 1999; PÁDUA, FONTOURA, MATHIAS, 2004). Encontram-se distribuídas por diferentes habitats: oceanos, corpos de água doce, solos, rochas, sobre a neve e superfície de vegetais; desde que disponham de luz e umidade suficientes (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

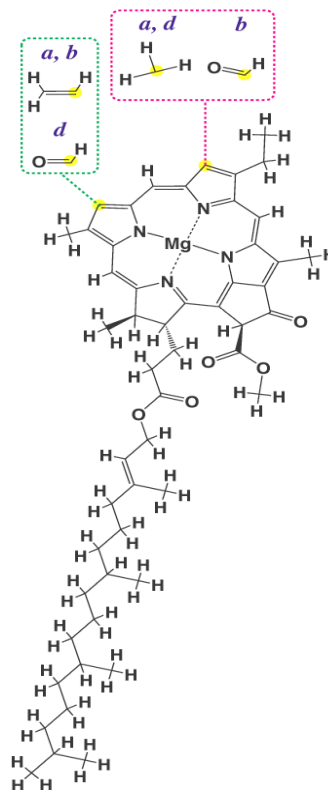


Figura 1. Estrutura comum às clorofilas a, b e d. Fonte: disponível em, <http://pt.wikipedia.org/wiki/Clorofila> acessado em 26 de julho de 2010.

As algas estão classificadas em quatro grupos principais: *Clorófitas* ou algas verdes, *Feofíceas* ou algas pardas, *Cianófitas* ou algas azuis (costumam caracterizar-se por serem algas unicelulares) e por último as *Rodófitas* ou algas vermelhas. Seus pigmentos correspondem: clorofilas, “a” e “b” encontradas nos plastídeos associadas com proteínas (figura 1). Existem outros pigmentos, tais como: ficobilinas, ficocianinas, fucoxantinas e ficoetrasinas (algas vermelhas) e carotenos.

As algas marinhas são de extrema importância para nosso ecossistema, pois são responsáveis por quase todo oxigênio produzido em nosso planeta. Elas podem apresentar diversas utilidades em nosso dia a dia, como na alimentação, indústria agricultura, microbiologia e cosméticos. Há cerca de cinco décadas, o mundo ocidental desconhecia praticamente tudo sobre as algas. Atualmente, muito se conhece sobre seus constituintes, como, por exemplo, que são ricos em mucilagens, carboidratos, vitaminas, fósforo, iodo, potássio, cloro, entre outros. Alguns desses elementos presentes nas algas não são encontrados com frequência em outros organismos, por isso, até em quantidades diminutas elas têm grande importância (NOSEDA, 1994). Os polissacarídeos de algas, além de conterem em sua estrutura açúcares bastante comuns, como a glicose, manose, xilose e galactose (figura 2), possuem açúcares bastante específicos e incomuns, diferentes dos encontrados em animais e vegetais terrestres como é o caso da fucose e da 3,6-anidrogactose (figura 2) (ZHANG et al., 2003).

As rodófitas são um dos três principais grupos de organismos fotossintéticos primários. Representam os principais constituintes das comunidades de macroalgas desde os pólos até os trópicos, e importantes produtores primários nos ecossistemas marinhos costeiros. Apesar de uma diversidade enorme de formas de vida e estratégias reprodutivas, as algas vermelhas não apresentam diferenciação tissular verdadeira, o que leva a alguns autores proporem que elas representam os eucariotos mais primitivos (REITH, 1995; STILLER, HALL, 1997).

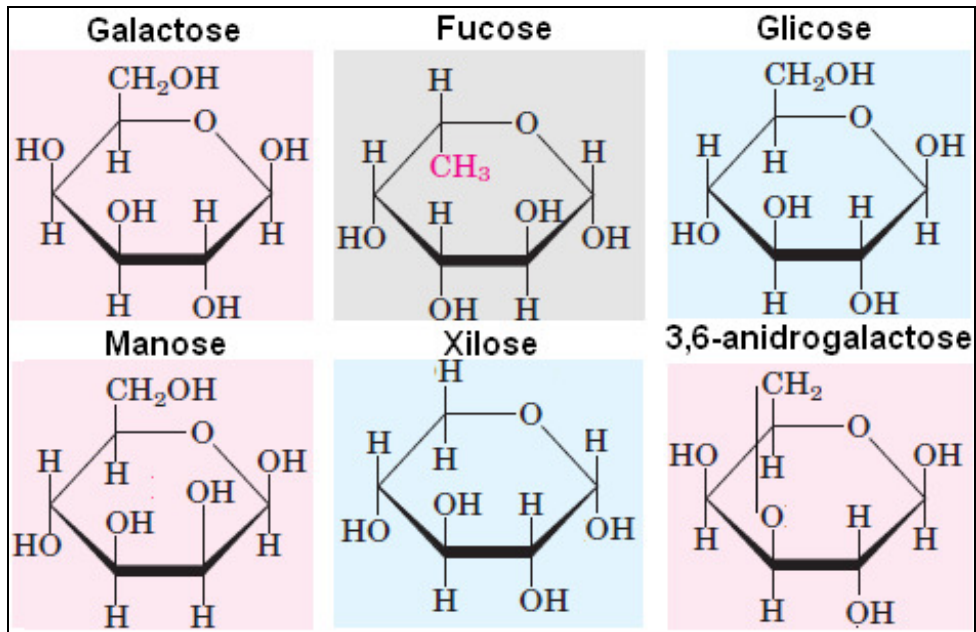


Figura 2. Estrutura química das unidades monossacarídicas comuns e específicos presentes em polissacarídeos de algas marinhas. Fonte: LEHNINGER, 2005.

1.2. Polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas

Polissacarídeos sulfatados estão muito difundidos na natureza, nas algas marinhas e em grande variedade de outros organismos. Nas algas marinhas, eles estão presentes como fucose sulfatadas e como galactanas sulfatadas (agaranas e carragenanas). No geral, a atividade biológica de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é relatada por sua estrutura molecular, tipo de açúcar e conteúdo de sulfato (SHANMUGAN & MODY, 2000). A tabela 1 mostra os polissacarídeos comercialmente mais importantes, tanto de origem animal como vegetal.

A agarana é constituída de dois componentes, a agarose e agarpectina que ocorrem em proporções variadas. A agarose contém unidades alternadas de D- e L-galactose. A estrutura da agarose no sistema aquoso é de uma dupla hélice. A agarose quando processada quimicamente a fim de se eliminar os seus grupamentos acídicos, dá lugar a Sepharose, muito empregada em cromatografia de exclusão molecular. A agarana é quase universalmente utilizada em cultura de microorganismos. Sua estabilidade em altas temperaturas permite a esterilização sem perda da força do gel. (RESS, 1969).

Tabela 01. Fontes usuais de alguns polissacarídeos. Fonte: CUNHA, PAULA, FEITOSA, 2009.

Origem	Polissacarídeo	Fonte
Algas	Alginato	algas pardas
	Agarinas	algas vermelhas
	Carragenanas	algas vermelhas
Exsudato de Plantas	Goma Arábica	<i>Acacia spp</i>
	Tragacante	<i>Astragalus spp</i>
Sementes	Guar	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>
	Alfarroba	<i>Ceratonia siliqua</i>
	Tamarindo	<i>T. indica</i>
Frutas	Pectinas	maçãs e laranjas
Tubérculo, cereais	Amido	milho, trigo, batatas
	Inulina	chicória, <i>Jerusalem artichokes</i>
Animais	Ácido Hialurônico	humor vítreo de bovinos, cristas de galináceos
	Heparina	pulmão de bovinos e intestinos de porcinos
	Quitina	carapaças de crustáceos
	Quitosana	carapaças de crustáceos
Fungos	Glucanas	<i>P. ostreatus</i> , <i>Agaricus blazei</i>
Bactérias	Xantana	<i>Xanthomonas ssp</i>
	Dextrana	<i>Leuconostoc spp</i>
	Gelana	<i>Sphingomonas elodea</i>

As carragenanas são constituídas basicamente de monômeros sulfatados de D-galactose ligadas alternadamente com α -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 3), formando repetições dissacarídicas. Além da galactose e sulfato, outros resíduos de carboidratos como xilose, glicose, ácidos urônicos (figura 2) podem estar presentes em baixas quantidades em preparações da carragenanas (VAN DE VALDE et. al., 2004). As carragenanas são classificadas de acordo com a presença de 3,6-anidrogactose, posição e número de grupos sulfato (figura 3) (RESS, 1969; MCCANDLESS & CRAIGIE, 1979).

Estes polissacarídeos são tradicionalmente divididos em seis formas básicas: carragenana Iota (ι), Kappa (κ), Lambda (λ), Mu (μ), Nu (ν) e Theta (θ). Esta nomenclatura é relevante tanto para a sua classificação química e para a produção comercial (CAMPO, 2009). A figura 3 mostra as duas famílias de Kappa (κ) e Lambda (λ) carragenanas, e suas subfamílias, com seus respectivos substituições de radicais.

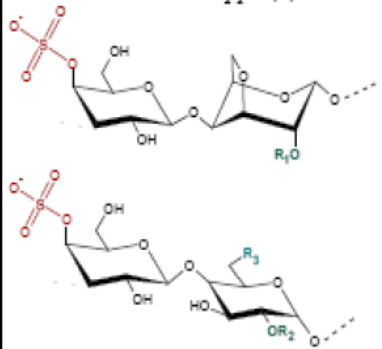
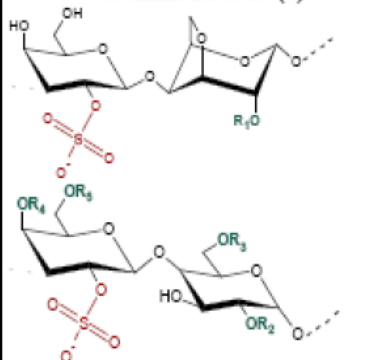
Estrutura	Subtipo	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Familia Kappa (κ)						
	<i>Kappa</i> (κ)	H	-	-		
	<i>Iota</i> (ι)	SO ₃ ⁻	-	-		
	<i>Mu</i> (μ)	-	H	SO ₃ ⁻		
	<i>Nu</i> (ν)	-	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻		
	<i>Omicron</i> (\omicron)	-	SO ₃ ⁻	H		
Familia Lambda (λ)						
	<i>Lambda</i> (λ)	-	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	H	H
	<i>Xi</i> (ξ)	-	SO ₃ ⁻	H	H	H
	<i>Pi</i> (π)	-	SO ₃ ⁻	H	Pir.	Pir.
	<i>Theta</i> (θ)	SO ₃ ⁻	-	-	-	-

Figura 3. Estrutura de carragenanas da família Kappa e Lambda com as suas respectivas substituições de radicais. Fonte: SOUZA, 2007.

“Carragenana” é um nome genérico para uma família de polissacarídeos, obtido por extração a partir de determinadas espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) (VAN DE VELDE et al., 2002). A extração aquosa de algas vermelhas para obter esses colóides hidrofílicos é conhecida em Portugal desde 1810 (STANLEY, 1987).

As carragenanas são utilizados em diversos produtos não alimentares, tais como produtos farmacêuticos e cosméticos (IMESON, 2000). Estes polissacarídeos estabilizam preparações de dentifrícios, absorve fluidos corporais quando formulada em curativos de ferida e interage com carotenos humanos para produzir uma pele macia, loções para as mãos e xampoo para os cabelos.

1.2.1. Propriedades biológicas das carragenanas

Carragenanas são utilizados como agentes para a indução experimental da inflamação e dor (MORRIS CHRISTOPHER, 2003). Quando injetadas subcutaneamente na superfície plantar de uma pata de rato, provocam uma

inflamação característica, que pode ser usada para quantificar o poder de ação de drogas antiinflamatórias (HENRIQUES et al., 1987; SALVEMINI et al., 1996; CUZZOCREA et al., 1998; SAMMONS et al., 2000). Elas também têm mostrado vários feitos biológicos incluindo propriedades antitumoral, imunomoduladoras (ZHOU et al., 2004), antiperlipidêmica (PANLASIGUI et al., 2003), antioxidante (SOUZA et al., 2007) e atividades anticoagulante (CACERES, et al., 2000). Alguns estudos *in vitro* sugerem que carragenanas também podem ter propriedades antivirais, inibindo a replicação do vírus do herpes e hepatite A (GONZALEZ, ALARCON, & CARRASCO, 1987; GIROND et al., 1991; MARCHETTI et al., 1995; CARLUCCI, SCOLARO, & DAMONTE, 1999).

O interesse em empregar antioxidantes de fontes naturais para aumentar a vida útil dos alimentos é consideravelmente reforçada pela preferência dos consumidores por ingredientes naturais e preocupações sobre os efeitos tóxicos dos antioxidantes sintéticos (FARAG et al., 2003). Nos últimos anos, muitos recursos marinhos têm atraído a atenção na busca de compostos bioativos para desenvolver novos medicamentos e alimentos naturais. Algas comestíveis são uma fonte rica de fibra alimentar, minerais e proteínas (KUDA et al., 2002;). As algas marinhas vem sendo considerado como uma fonte rica em antioxidantes (NAGAI & YUKIMOTO, 2003).

1.3. Espécies reativas do oxigênio

Cada átomo contém um núcleo, que é cercado por um ou mais pares de elétrons. Um único elétron em uma órbita é chamado de um elétron desemparelhado. Um elétron desemparelhado em torno do núcleo constitui uma radical (KAUL et al., 1993). Os radicais livres são altamente reativos com radicais e derivados não-radicais. Na verdade, radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Como em sua maioria são derivados do metabolismo do oxigênio, no decorrer deste texto utilizaremos o termo “espécies reativas do oxigênio” (ERO) para referirmos a eles. ERO's, subprodutos altamente tóxicos do metabolismo aeróbico, reagem desfavoravelmente com macromoléculas circundante, resultando em danos graves a células dos tecidos. O oxigênio molecular é uma das principais fontes de formação ERO's em ambientes intracelulares e extracelulares (KUMAR & JUGDUTT, 2003). Estas espécies

reativas são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O .

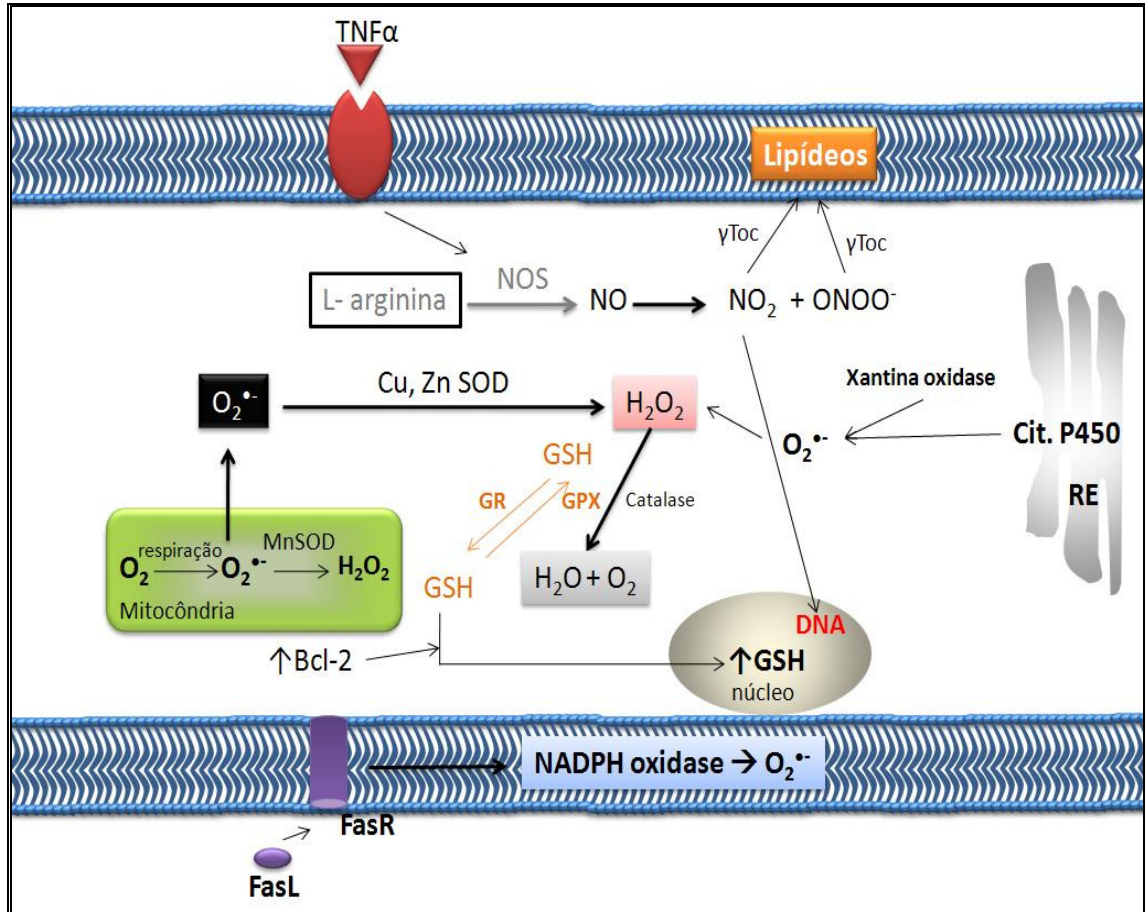


Figura 4. Fontes intracelulares de EROs e principais mecanismos de defesa antioxidante. Fonte: ANAZETTI & MELO, 2007.

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O_2 (ROSS & MOLDEUS, 1991). A figura 4 mostra as maiores fontes produtora de ERO's, incluindo a mitocôndria, retículo endoplasmático, membrana plasmática e citosol. A mitocôndria gera o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) durante a respiração, que é convertido a H_2O_2 pela Mn-Superóxido desmutase (SOD). No citosol, $O_2^{\bullet-}$ é convertido a H_2O_2 pelo Cu, Zn- SOD. As duas maiores defesas contra H_2O_2 são o ciclo redox da glutatona presente em ambos, citosol e mitocôndria, e catalase presente na fração peroxissomal. Outras fontes de $O_2^{\bullet-}$ incluem as enzimas xantina oxidase no citosol, NADPH oxidase na membrana

plasmática e citocromo P450 no retículo endoplasmático. Bcl-2, que está relacionado com o ciclo celular e apoptose podem funcionar como antioxidante em alguns sistemas apoptóticos induzindo a realocização de glutatona no núcleo. O óxido nítrico (NO) pode ser produzido no citosol ou na mitocôndria por espécies reativas do nitrogênio (ERN). Adicionalmente, o fator de necrose tumoral (TNF) pode aumentar a produção das ERN através do aumento de óxido nítrico sintetase (NOS) e produção de NO. O óxido nítrico pode reagir com lipídeos de membrana e podem causar mutações no DNA. Além disso, ONOO⁻ pode induzir peroxidação lipídica (ANAZETTI & MELO, 2007) (Figura 4).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos ERO's tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993). A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, freqüentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimática, mas a produção de uma grande quantidade de ERO's pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (AMES et al., 1993; WITZUM, 1994; ROY & KULKARNI, 1996; STAHL & SIES, 1997) e outras (Tabela 2). Os danos no DNA causados pelas ERO's também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN et al., 1998).

O consumo de compostos antioxidantes na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra esses agentes reativos que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina (DOROSHOW, 1983; HALLIWELL et al., 1995; WEIJL et al., 1997).

Tabela 2. Eventos relacionados a espécies reativas de O₂. * Adaptado de COHEN, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992;.

Eventos relacionados a espécies reativas de O ₂ *
Envelhecimento
Mutações
Câncer
Aterosclerose
Lesão por toxicidade de O ₂ em pulmão e retina
Lesão pós-isquemia e reperfusão de cérebro, coração, pele, intestino, pâncreas, fígado, músculo, rins e pulmões
Lesão pós-concussão cerebral e pós-hipertensão intracraniana
Síndrome demencial
Disfunção renal pós-transplante
Artrite reumatóide
Hemocromatose transfusional
Doenças auto-imunes

1.3.1. Peroxidação lipídica

As membranas das células e organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolípidios e do colesterol e danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana

Basicamente, a peroxidação lipídica (PL) consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado (AGPI) para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos a PL pode ocorrer, principalmente, por duas vias: (i) uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos AGPI e (ii) a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, metais de transição e outros radicais livres (AL MEHDI et al., 1993; PORTER et al., 1995).

O processo da peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 5). A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o AGPI sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH₂-), formando um novo radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999). O processo de propagação ocorre reações em cadeia com aumento do número de

moléculas reativas. A terminação ocorre com a formação de uma molécula neutra. (Figura 5)

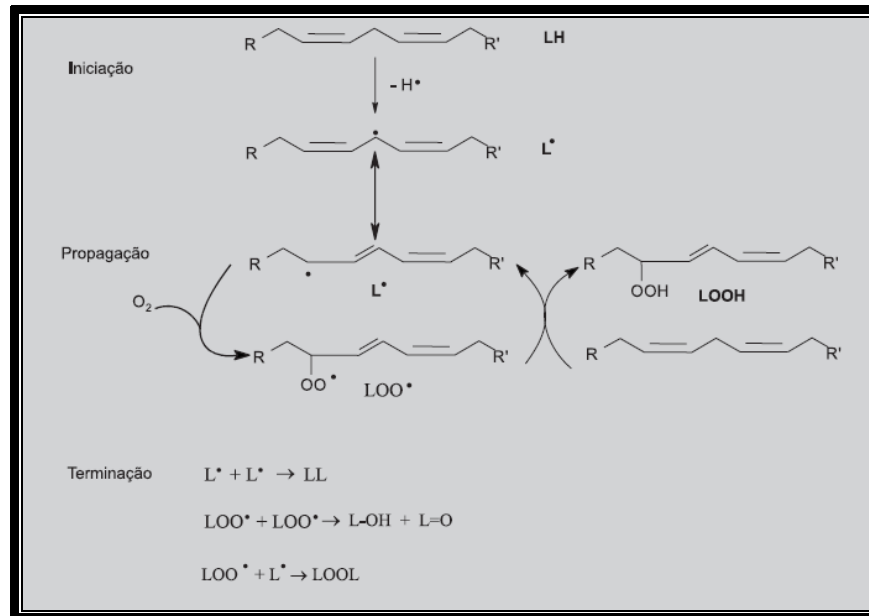


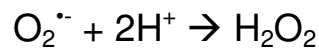
Figura 5. Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica. Fonte: LIMA & ADBALA, 2001.

A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peróxido ou alcóxido e desta forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante. Entre estes antioxidantes está o α -tocoferol, que interage com o oxigênio singlete e fornece átomos de hidrogênio para o radical peróxido dos ácidos graxos, impedindo desta forma a reação em cadeia que se propaga nas membranas lipídicas (TIIDUS et al., 1993).

1.3.2. Radical superóxido

Pode ser escrito como $O_2^{\bullet -}$ ou O_2^- e é formado após a primeira redução do O_2 . O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986). Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de O_2^- . (seja enzimático, fagocítico ou químico) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H₂O₂), através do processo chamado dismutação (PAL YU, 1994). Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação a 10⁴ vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (reação abaixo).



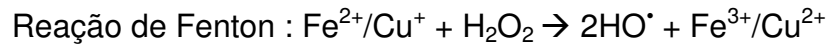
1.3.3. Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre; no entanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Outras espécies reativas de interesse são os oxigênios singletes, que são formas de oxigênio spin-alteradas. Esses metabólitos derivados do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas (FISCHER, 1987), e em geral alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem. Quando o H₂O₂ recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil (HO[•]) (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004)

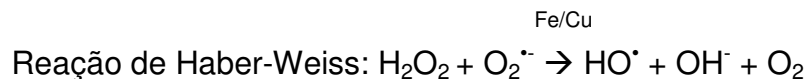
1.3.4. Radical hidroxila

O radical hidroxila (HO[•]) é o mais reativo das moléculas de radicais livres (DROGE, 2002). A combinação extremamente rápida do HO[•] com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o HO[•] for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o HO[•] pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986).

O radical hidroxila pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre. A reação é conhecida como Reação de Fenton.



Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à produção de HO^\bullet , a chamada Reação de Haber-Weiss.



O ferro e o cobre são transportados, utilizados e estocados ligados a proteínas específicas (transferrina, ferritina e ceruloplasmina), as quais previnem ou minimizam as reações de oxidação catalisadas por estes minerais. Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução. (WELCH, 2002)

1.4. Inflamação – Aspectos gerais

A inflamação constitui um processo homeostático desencadeado pelo organismo após lesão tecidual ou infecção local, e como consequência pode ocasionar reparo da lesão, ou o isolamento ou ainda a destruição do agente agressor, levando a ativação dos mecanismos de reparo necessários para garantir o restabelecimento das suas funções normais (LEVY, 1996).

Esta resposta inflamatória aguda consiste em dois componentes: uma reação inata, e uma adquirida e específica (TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2005). A reação inata envolve os eventos que ocorrem localmente no interior dos tecidos e podem ser divididos em vasculares e celulares. Os eventos vasculares compreendem a vasodilatação, com consequente aumento do fluxo sanguíneo local, o aumento da permeabilidade vascular e a exsudação plasmática. Tais eventos são importantes na medida em que promovem um aumento local da concentração de mediadores de origem plasmática, entre eles os componentes do sistema complemento, da coagulação, do sistema fibrinolítico e das cininas. Concomitantemente, são desencadeados os eventos celulares, onde há a saída de leucócitos circulantes da luz do vaso sanguíneos e a sua migração para o sítio da

inflamação. Esse fenômeno segue algumas fases como captura, rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme e transmigração (MUNRO, 1993; SPRINGER, 1994; WAHL et al., 1996) (figura 6).

A resposta inflamatória tem como finalidade dominar, minimizar, enclausurar, neutralizar, destruir e eliminar a causa da agressão e induzir a reparação, a qual implica em reposição de células e tecidos mortos por células saudáveis, oriundas do epitélio adjacente. Os principais efeitos desta resposta são um aumento no suprimento sanguíneo, um aumento na permeabilidade vascular para moléculas séricas de alta massa molecular e o favorecimento da migração dos leucócitos. Se não existisse o processo inflamatório, os microorganismos estariam livres para penetrar nas mucosas e feridas, proliferar, disseminar e finalmente comprometer de tal forma o organismo hospedeiro que fatalmente o mataria. Por outro lado, se não existisse a inflamação, não existiria a cicatrização de feridas, e por consequência o tratamento e a reparação das lesões. Em geral, estas reações constituem um mecanismo defensivo contra inúmeras agressões, em muitos casos, a reação inflamatória possa causar danos ao organismo, existindo ocasiões em que o processo inflamatório pode interferir na função do órgão acometido, com a perda do controle da resposta. Nesta circunstância, a inflamação passa a ter um papel maléfico conforme observado em doenças como cirrose hepática, artrites reumatóides, ceratites, entre outras (STEVENS, 1998; ROITT et al., 1999).

A resposta inflamatória aguda é um tipo de resposta relativamente inespecífica e suas funções mais importantes estão relacionadas com a eliminação dos tecidos mortos, proteção contra infecções locais, assim como, permitir o acesso do sistema imune à área danificada. Havendo persistência do agente lesivo, inicia-se a inflamação crônica, neste processo há destruição contínua dos tecidos e tentativas de cicatrizações por reparo fibroso, além de respostas imunes concomitantes (STEVENS, 1998)

A reação inflamatória, geralmente, é produzida por agentes inflamatórios simples que vão agir em órgãos onde é fácil a avaliação qualitativa e quantitativa dos diferentes fenômenos ou momentos da inflamação. Diversos modelos utilizados no estudo do processo inflamatório são citados por PEREIRA e BOGLIOLO (1998).

Estudos mostram uma relação do processo inflamatório com as ERO's. SCHÄPPI e colaboradores (2008) relataram efeitos anti-inflamatórios do sistema NADPH e ROS. Um estudo recente em camundongos com defeito para a geração

de ROS sugerem fortemente os efeitos anti-inflamatórios de espécies de oxigênio (ROMANI et al., 2008). Em consonância com isso, pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC) com defeitos no sistema NADPH e conseqüentemente deficiência na geração de EROs (HOLMES, PAGE, GOOD, 1967) apresentavam um fenótipo inflamatório caracterizado por granulomas e doença de Crohn (WINKELSTEIN et al., 2000).

1.4.1. Migração celular

Para realizar a função de defesa, as células do sistema imune devem migrar através dos tecidos. As células T, por exemplo, que circulam continuamente através dos tecidos, sangue e linfa à procura de antígenos invasores, atravessam repetidamente barreiras endoteliais e ao menos brevemente, entram em contato com matriz extracelular. Da mesma forma, os macrófagos normalmente migram através dos tecidos removendo células apoptóticas ou necróticas e proteínas desnaturadas. Todas as células do sistema imune podem migrar rapidamente junto a algum sítio inflamatório ou infeccioso. Então, uma das características principais do sistema imune é a migração de células, um processo que exige eventos de adesão transitórios, reguláveis e reversíveis (BROWN, 1997).

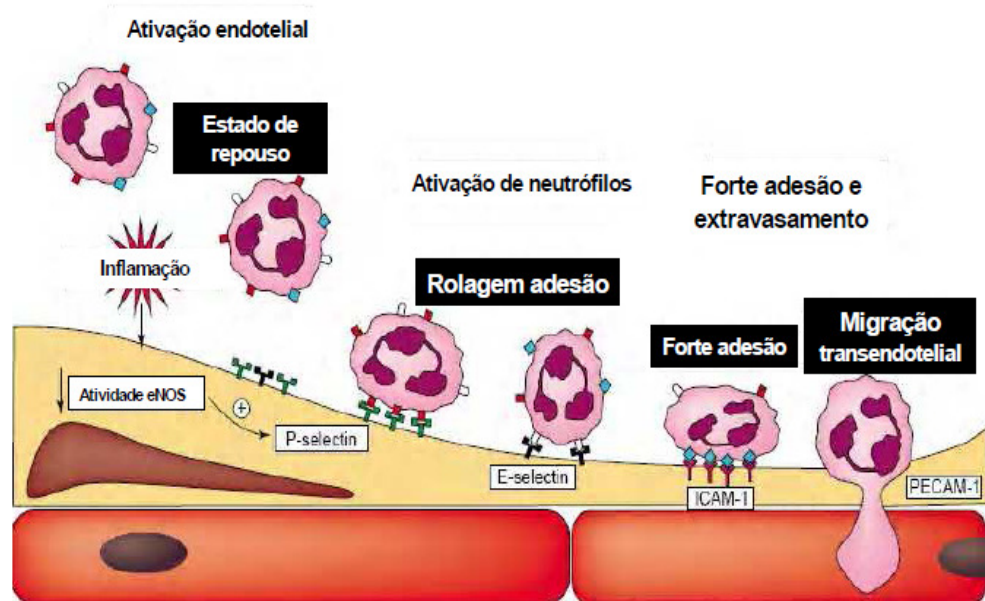


Figura 6. Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular. Fonte: Adaptado de KAKKAR & LEFER, 2004.

A seqüência de eventos que resulta na passagem dos leucócitos do vaso para os tecidos, chamado extravasamento, inclui três passos, (1) no vaso: marginação, rolagem e adesão; (2) transmigração através do endotélio (diapedese); (3) migração nos tecidos em direção a estímulos quimiotáticos. A marginação é causada por mudanças nas condições hemodinâmicas da circulação sangüínea e os leucócitos assumem uma posição periférica ao longo da superfície endotelial. Em seguida, os leucócitos aderem transitoriamente ao longo do endotélio (rolagem) e finalmente alguns pontos se aderem firmemente (adesão). Depois, os leucócitos inserem pseudópodos entre as junções das células endoteliais assumindo uma posição entre estas células e a membrana basal. Eventualmente, os leucócitos atravessam parede dos vasos e passam para o espaço extravascular (TRAVIS, 1993) (figura 6).

1.4.2. Citocinas

Citocinas, incluindo IL-6, TNF- α , fatores de crescimento e diferenciação fatores são secretados ou às proteínas da membrana pequena moléculas que regulam diversos processos fisiológicos, tais como crescimento, desenvolvimento, diferenciação, cicatrização e resposta imune (LU, OUYANG & HUANG, 2006; MIKI et al., 2007). Apesar da natureza complexa da sua função, as citocinas podem ser amplamente classificadas como inflamatórias (por exemplo, IL-6 e IL-17) e anti-inflamatórias (por exemplo, IL-10). Algumas citocinas têm sido relatados por desempenharem um papel na inflamação associada a carcinogênese (LIN & KARIN, 2007)

Tradicionalmente, as citocinas são classificadas de acordo com estes três critérios: i) propriedades biológicas (pró- ou anti-inflamatórias); ii) das moléculas receptoras que são utilizadas; e iii) estrutura tridimensional. Apesar da carência de identidade na seqüência de aminoácidos, em 1990, Bazan fez uma primeira classificação das citocinas, e, nessa classificação, ficaram agrupadas como de uma mesma família aquelas que possuíam uma estrutura em cadeia de α -hélice. Posteriormente, esta família foi dividida em citocinas α -hélice de cadeia curta e de cadeia longa. A estas últimas pertence à família atualmente conhecida como Família Interleucina-6. É geralmente aceito que a interleucina-6 (IL-6) participa desta família,

que é composta de IL-6, IL-11, IL-12, fator inibidor da leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), eritropoietina (Epo), hormônio do crescimento (GH), pro-lactina (PRL), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator de crescimento neurotrófico (CNTF), cardiotrofina 1 (CT-1), uma citocina tipo cardiotrofina (CLC) e a leptina. A comparação da IL-6 de ratos com a dos seres humanos revela uma identidade de sequência de DNA de aproximadamente 65% e de 42% em termo de conteúdo protéico. A região N-terminal entre ambas as citocinas não apresenta identidade, mas há quatro resíduos de cisteína que são preservados nas porções centrais de ambas as proteínas. Originariamente, considerou-se que esta zona pudesse ser muito importante para o desenvolvimento da atividade da IL-6, embora esta se mantivesse completamente funcional ao se gerar uma IL-6 recombinante que não apresentava estes resíduos (CHAHADE, 2009). Um sumário das ações pleomórficas de IL-6 pode ser visto na figura 7.

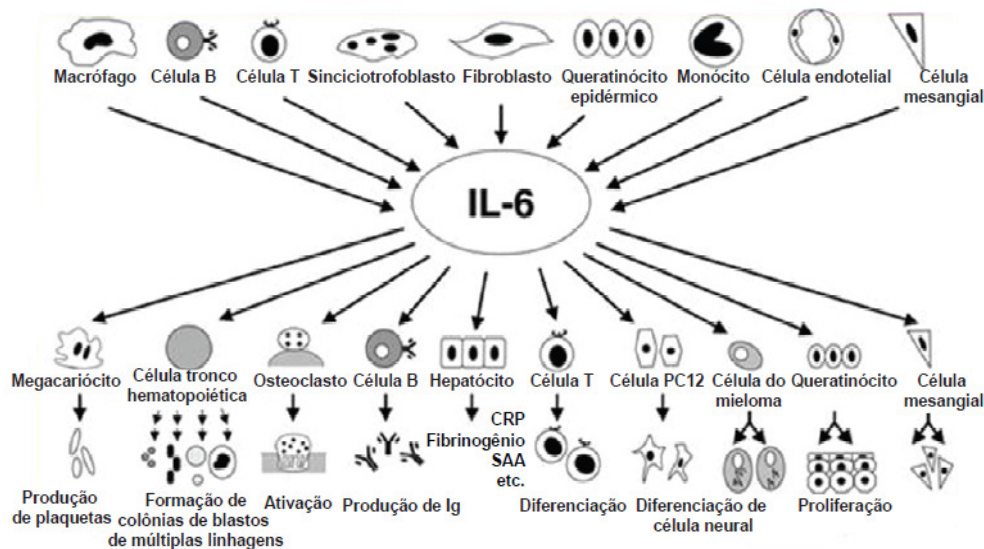


Figura 7. Ação pleomórfica da IL-6 no organismo. Fonte: SCHEINBERG, 2009.

1.4.3. Sistema complemento

Designa-se sistema complemento (SC) a um complexo protéico polimolecular constituído por várias substâncias que se encontram no plasma sanguíneo, nas membranas celulares e desempenham um papel importante em diferentes tipos de reações imunoinflamatórias (ADELSBERG, 1987).

O entendimento crescente sobre a biologia do sistema complemento e hemostasia tem indicado várias interações interessantes que existem entre estas

duas entidades. À luz das recentes investigações, ambos os sistemas podem ser vistos como parceiros em uma inflamação que visa à estabilização de um sistema vivo que encontrou diversas perturbações à sua homeostasia. A cascata do complemento é ativada pelos mesmos estímulos da inflamação: por exemplo, quando o perigo de infecção é detectado ou o tecido do hospedeiro está danificado (NATHAN, 2002). Estas situações são geralmente também associadas a um aumento da propensão para a coagulação sanguínea (ESMON, 2004). Em contrapartida, trauma que causa prejuízo à vascularização e subsequente sangramento, normalmente ativam a coagulação do sangue, e também está associada a um risco de infecção e a ativação de uma reação inflamatória (KEEL & TRENTZ, 2005).

Portanto, na maioria das situações fisiopatológicas, parece que a ativação de ambos, sistema complemento e cascatas de coagulação, ocorre simultaneamente. Essa ativação simultânea de hemostasia e inflamação é protetor, e em muitas circunstâncias clínicas, é benéfico para o hospedeiro por uma eficiente resposta a patógenos ou a estímulos do início do sangramento. Por exemplo, é evidente que o sistema de coagulação tem um importante papel na interação patógeno-hospedeiro e a capacidade de resposta do hospedeiro a infecção. A formação local de trombos (coágulos de sangue no lúmen dos vasos sanguíneos intatos) na microvasculatura de drenagem no local da invasão microbiana competente fornece uma barreira que impede a propagação de bactérias para a circulação (SUN, 2006). De fato, várias cepas de bactérias desenvolveram estratégias que envolvem a produção e secreção de vários fatores fibrinolíticos que permitem aos organismos superar essas limitações (SCHROEDER, 1999). É importante notar que o sistema complemento e a cascata de coagulação destinam-se a agir localmente - isto é, o complemento é ativado no local de infecção e coagulação no local da hemorragia. No entanto, quando estas cascatas são ativadas sistemicamente como o resultado de uma falha dos mecanismos de controle relevantes, os efeitos desta reação generalizada ameaçam seriamente o hospedeiro (MACIEJ, 2007).

Para que o SC exerça as suas funções, deve ser ativado, originando assim uma série de fragmentos com diferentes características e funções específicas. As duas fases do sistema complemento podem ser alcançadas através de 3 vias diferentes, a via clássica, a via alternativa (figura 8) e a via das lectinas (GADJEVA;

THIEL; JENSENIUS, 2000). A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e imunoglobulinas agregadas (FRANK, 1987). As imunoglobulinas humanas que iniciam a ativação do complemento pela via clássica pertencem às classes IgM e às subclasses IgG1, IgG2, IgG (LAW, 1988; FRANK, 1987). A presença de certos agentes como determinados fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos com determinadas características, especialmente a ausência de ácido siálico na membrana, são suficientes para ativar a via alternativa, através da ligação de uma ou mais moléculas de C3b na sua superfície (SILVA, 1984; GÖTZE, 1988). A membrana da hemácia de coelho possui também esta propriedade (PLATTS-MILLS & ISHIZAKA, 1974).

O emprego de proteínas regulatórias e peptídeos inibitórios, entre outras drogas, vêm auxiliando no tratamento de desordens e doenças relacionadas ao complemento possibilitando, às vezes a cura, com também uma melhor compreensão das inter-relações existentes entre os componentes do complemento e outros sistemas orgânicos. (MARKIDES, 1998)

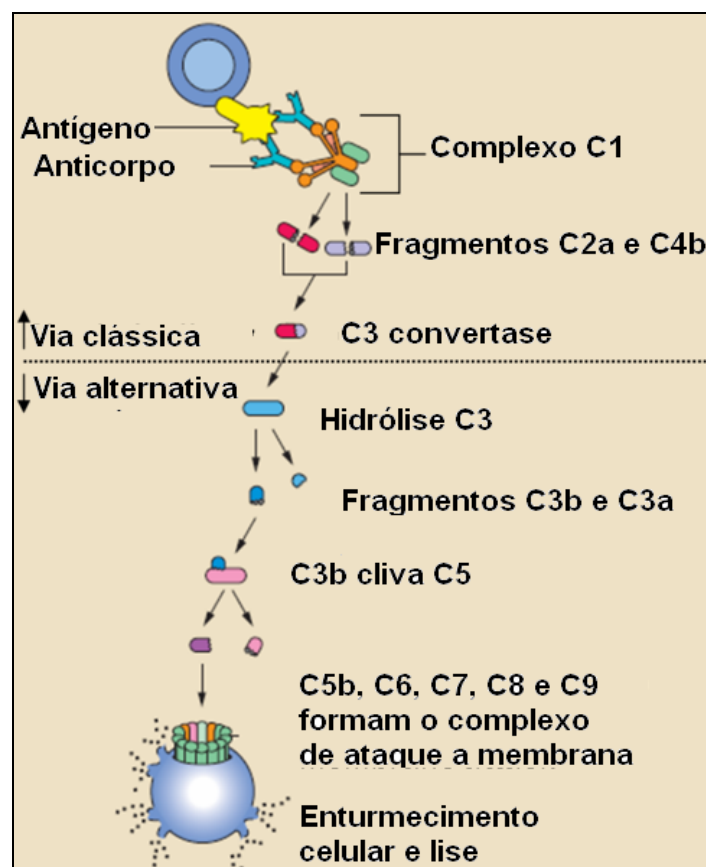


Figura 8. Via clássica e alternativa do sistema complemento. Fonte: disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Complement_pathway.png, acessado em 26 de dezembro de 2009

Lipopolissacarídeos (LPS) presentes em membranas de bactérias podem estimular o sistema complemento, sendo que a resposta a esses compostos é altamente variável, e resulta da variabilidade genética entre os indivíduos de expressar o principal receptor para LPS denominado TLR-4 (MICHEL et al., 2003). O LPS é um estimulador potente da ativação de monócitos e macrófagos, induzindo a adesão e espalhamento dessas células. Recentes evidências indicam que o LPS induz a reorganização de filamentos de actina, bem como a fosforilação de algumas proteínas acessórias tais como PyK2 (tirosina quinase rica em prolina) e a paxilina, em monócitos e macrófagos (WILLIAMS, 2000).

1.5. Coagulação sanguínea

Após a lesão vascular, as plaquetas aderem às macromoléculas em tecidos subendoteliais e agregados para formar um tampão plaquetário. As plaquetas estimulam a ativação local dos fatores de coagulação do plasma, levando à geração de um coágulo de fibrina que reforça o agregado de plaquetas. Idéias atuais sobre o (s) mecanismo (s) de coagulação do sangue que se baseia em no modelo de cascata foi introduzida no início da década de 60 (DAVIE & RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). Tradicionalmente, a coagulação foi dividida em uma via intrínseca, uma extrínseca, e uma via comum. O via intrínseca foi pensado para ser iniciada pela ativação dos fatores de contato e envolve a ativação subsequente de caliceína, fator (F)XII, FXI e FIX, levando a ativação do fator X. A via intrínseca é iniciada por um fator tecidual (FT) sobre a expressão de lesão tecidual e posterior formação complexo de FT com FVII, que também resulta em ativação de FX. Na via comum, FX ativado ativa protrombina finalmente levando à formação de fibrina. Embora o conceito distingua a via intrínseca e extrínseca, serviu por muitos anos como um modelo útil para a coagulação, as vias não são, de fato, redundante, mas estão interligadas. Para exemplo, altos níveis de FT no complexo com FVIIa diretamente ativa o FX, enquanto que em baixas concentrações de FT, a ativação FX envolve não somente FVIIa mas também FIXa da via intrínseca (OSTERUD & RAPAPORT, 1977; MARLAR, KLEISS, GRIFFIN, 1982). A hipótese atual sobre o início de coagulação do sangue é, portanto, que após a lesão vascular, FT é exposta ao sangue e forma um complexo com FVII. Posteriormente, o complexo FT/FVII ativa FX diretamente (via extrínseca) ou indiretamente através da ativação do FIX (via

intrínseca), resultando em clivagem da protrombina em trombina, mediada pela FXa. A trombina cliva fibrinogênio em fibrina (monômeros de fibrina forma polímeros) e um coágulo de fibrina é formada. Além disso, a trombina ativa o FXI, FVIII e FV, resultando em aumento da produção de FIXa e FXa, aumentando assim a produção de trombina (GAILANI & BROZE, 1991; NAITO & FUJIKAWA, 1991). Para evitar complicações trombóticas devido ao excesso ou formação de fibrina extemporânea, vários mecanismos de regulação existem, envolvendo proteínas anticoagulantes. Dentre as proteínas anticoagulantes endógenas, existe a proteína S, o qual atua como um co-fator para ação anticoaguante da proteína C, onde esta detém essa função por inativação dos fatores Va e VIIIa.

No entanto, a separação da cascata de coagulação em intrínseco e extrínseco, é atualmente entendida como inadequada do ponto de vista de fisiologia da coagulação, tendo em vista que a divisão não ocorre *in vivo* (FRANCO, 2001).

Atualmente, se aceita que mecanismos hemostáticos, fisiologicamente relevantes estejam associados com três complexos enzimáticos procoagulantes, os quais envolvem serinoproteases dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX e X) associadas a cofatores (V e VIII), todos localizados em uma superfície de membrana contendo fosfolipídeos (COLMAN et al. 2001; JENNY NS & MANN, 1998). Os complexos encontram-se esquematizados na figura 10. O início da coagulação se faz mediante ligação do fator VIIa ao fator tecidual (FT), com subsequente ativação dos fatores IX e X. O complexo fator IXa/fator VIIIa ativa o fator X com eficiência ainda maior, e o fator Xa forma complexo com o fator Va, convertendo o fator II (protrombina) em fator IIa (trombina). A superfície de membrana celular em que as reações ocorrem também encontra-se representada (Figura 9). As diversas enzimas da coagulação convertem seus substratos procofatores em cofatores, os quais localizam as proteases sobre as superfícies celulares, contendo fosfolipídeos (em especial das plaquetas), em que essas reações acontecem (FRANCO, 2001).

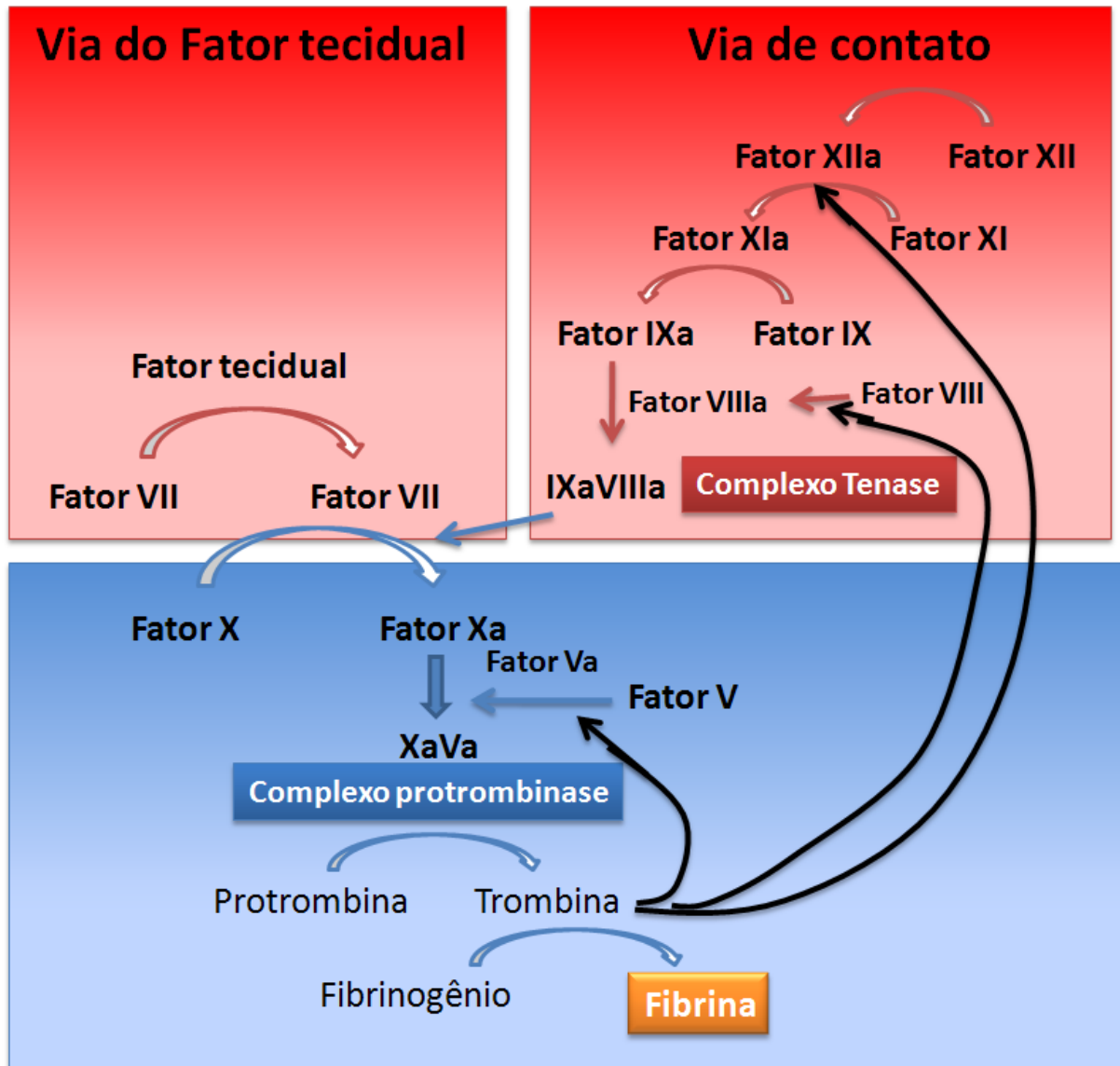


Figura 9. Representação esquemática dos complexos procoagulantes. Fonte: Coagulação sanguínea. Fonte: disponível em www.cardiovascularweb.com, acessado em 01 de agosto de 2010

Os elementos biológicos que contribuem para o componente de fosfolípidos da coagulação incluem tecidos vasculares lesados, células inflamatórias e plaquetas ativadas. O principal contribuinte, em termos de números de sítios, são as membranas de plaquetas, que, quando ativadas, expressam sítios de ligação para os complexos fator IXa/fator VIIIa (complexo “tenase”) e fator Xa/fator Va (complexo “protrombinase”) (figura 9). Adicionalmente, íons de cálcio são necessários em diversos passos das reações da coagulação. A iniciação do processo de coagulação depende da exposição do sangue a componentes que, normalmente, não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (injúria vascular) ou alterações bioquímicas (por ex., liberação de citocinas). Qualquer que

seja o evento desencadeante, a iniciação da coagulação do sangue se faz mediante expressão do seu componente crítico, o fator tecidual (FT), e sua exposição ao espaço intravascular (FRANCO, 2001).

1.5.1. Agentes anticoagulantes

Desde a sua descoberta por McLean em 1915 (MCLEAN, 1959), heparina tornou-se um anticoagulante utilizado para o tratamento e prevenção de doenças trombóticas e manter a fluidez do sangue em dispositivos extracorpórea (JOHNELL et al., 2002). O efeito anticoagulante da heparina é mediada principalmente por sua ligação a antitrombina (AT), acelerando assim a inibição do fator Xa (FXa) e trombina no plasma (BISACCHI, 2003). Após a lesão vascular, são ativadas enzimas (fatores plasmáticos) que iniciam a 'cascata' de coagulação, até a ativação do fator X e do fator II (protrombina), responsáveis pela ativação da trombina, enzima que induzirá a transformação de fibrinogênio em fibrina (proteína filamentosa que forma os coágulos, interrompendo a perda de sangue). O co-fator II da heparina e a antitrombina inibem a ação da trombina e têm sua atuação acelerada pela heparina (POMIN & MOURÃO, 2006).

A figura 10 mostra a representação molecular da ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados. A trombina (em azul) é inibida pela ação da antitrombina (em verde) e do co-fator II da heparina (em laranja). Em ambos os casos, o polissacarídeo sulfatado (em cinza) aproxima o inibidor e a trombina, através da interação de suas cargas negativas com as cargas positivas dessas moléculas (na trombina, a interação ocorre no sítio denominado EXO II). Em seguida, o grupo hidroxila (-OH) do aminoácido serina (S), presente na trombina, liga-se a aminoácidos situados na extremidade 'C' dos inibidores – a arginina (R), na antitrombina, e a lisina (L), no co-fator II de heparina. No entanto, o polissacarídeo sulfatado altera o mecanismo anticoagulante do co-fator II da heparina, induzindo nesse inibidor uma modificação estrutural que permite a interação de sua extremidade 'N' com o sítio EXO I da trombina (POMIN & MOURÃO, 2006).

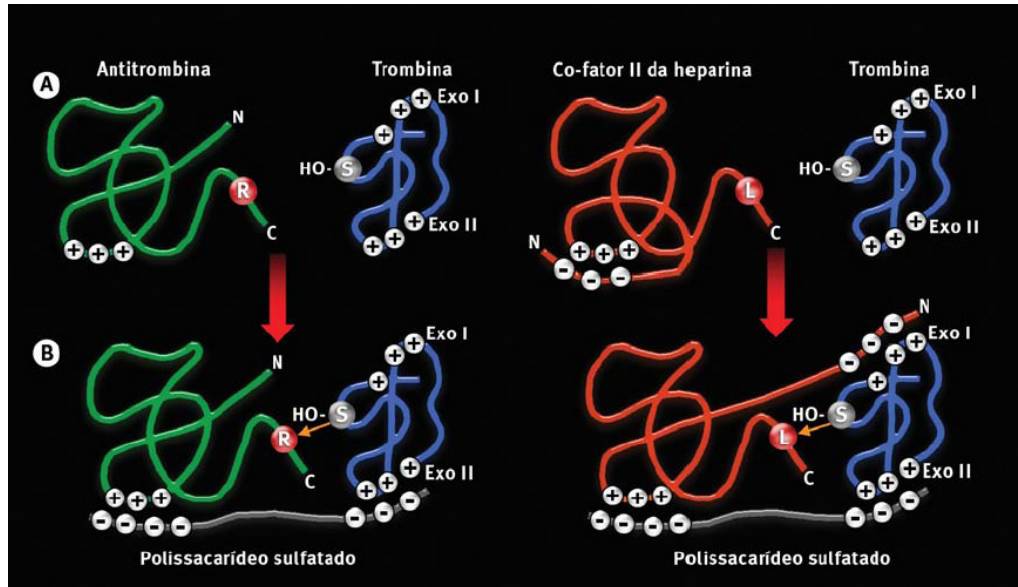


Figura 10. Representação molecular da ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados. Fonte: POMIN & MOURÃO, 2006.

Infelizmente, a principal complicação com a terapia de heparina é o risco de sangramento além, de provocar também outros problemas, incluindo trombocitopenia, e sua pobre biodisponibilidade (BLAISDELL, 1996; GREINACHER & WARKENTIN, 2006). Justifica-se a necessidade clínica para o surgimento de novos anticoagulantes eficazes e seguros quando utilizadas em conjunto com os agentes à terapia antiplaquetária fibrinolítica ou em pacientes com doenças cardiovasculares (HIRSH, 2001; STONE & SHORE-LESSERSON, 2006). Polissacarídeos com atividade anticoagulante foram encontrados não só em mamíferos (BISACCHI, 2003; BEMILLER, 2008), mas em algas marinhas (PEREIRA, MULLOY, & MOURÃO, 1999; FARIAS, VALENTE, PEREIRA & MOURÃO, 2000; MAYER & HAMANN, 2002, 2004, 2005, 2007).

Estudos sobre organismos marinhos na busca de substâncias bioativas de origem natural vêm despertando interesses da comunidade científica e vários trabalhos têm sido publicados confirmando atividades farmacológicas apresentadas por estes compostos. Estas informações demonstram a importância da pesquisa científica na identificação da atividade farmacológica e mecanismos de ação de extratos de algas marinhas, para descobertas de novos compostos bioativos

A alga marinha vermelha *Amansia multifida*, objeto desse estudo, está amplamente distribuída no litoral do Nordeste brasileiro (PABLO RIUL, 2009), no entanto, não existe nenhum trabalho relacionado com as funções biológicas de seus polissacarídeos sulfatados.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar físico e quimicamente e estudar os efeitos biológicos das frações polissacarídicas da alga marinha vermelha *Amansia multifida*.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fisicamente as frações polissacarídicas da alga vermelha *A. multifida*;
- Caracterizar quimicamente as frações polissacarídicas da alga vermelha *A. multifida*;
- Avaliar a atividade antioxidante destas frações.
- Verificar ação das frações na coagulação sanguínea, *in vitro*;
- Analisar a ação inflamatória das frações de *A. multifida*, *in vitro* e *in vivo*;
- Mensurar o efeito citotóxico das frações polissacarídicas, sobre células normais e tumorais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Alga

A alga marinha utilizada neste estudo, *Amansia multifida*, foi coletada na praia de Búzios (RN) durante a maré baixa, sendo posteriormente catalogada pela Dra. Heliane Marinho Soriano do Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN (Figura 11). Logo após a coleta, as algas foram limpas e secas em estufa a 45°C.

Divisão: Rhodophyta

Classe: Florideae

Ordem: Ceramiales

Família: Rhodomelaceae

Gênero: *Amansia*

Espécie: *Amansia multifida*



Figura 11. Alga marinha *Amansia multifida*

3.1.2. Animais

O efeito na inflamação dos polissacarídeos da alga *A. multifida* foi avaliado no modelo de peritonite aguda utilizando-se camundongos *Swiss* com dois meses de idade, pesando entre 25–30 g, obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica - UFRN. Todos os animais utilizados experimentalmente foram mantidos em gaiolas individuais, submetidos à água e dieta *ad libitum* em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura constante a 25°C. Os animais foram acondicionados no laboratório, por no mínimo, 2 h antes dos testes e utilizados uma única vez para os experimentos. Os ensaios foram desenvolvidos de acordo com as normas vigentes, tendo sido aprovado pelo comitê da UFRN, com número de protocolo 048/2009 (documento em anexo).

3.1.3. Outros materiais

- Ácido acético, acetona, metanol, etanol, cloreto de sódio da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Agarose (Standart Low-Mr) da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA)
- Azul de toluidina, vermelho de cresol, coomassie brilliant blue R 250 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA).
- Kits comerciais para a avaliação dos tempos de PT (Soluplastin, Wiener lab. Argentina) e APTT (DiaMed- Lationo América, AS. Lab Brasil)
- NADH, 1,2-diaminoetano, 1,3-diaminopropano, antrona, carbazol, brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON), ácido isobutírico, piridina, N-N-metil bisacrilamida, e tolueno da Aldrich Chemical Co. Inc. (Millwaukee, WI, EUA).
- Papéis Whatman n.º 1 e 3 MM foram obtidos da W & R Balston Ltd. (Maidstone, Inglaterra).
- Solução salina 0.9 % (estéril e apirogênica)
- EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) (Reage)
- EGTA (SIGMA)
- Tampão veronal GVB-EDTA (SIGMA)

- Tampão venoral GVB (SIGMA)
- DMSO (Merck)
- NADH (SIGMA)
- Fenazina (SIGMA)
- Ácido tiobarbitúrico (Merck)
- Ácido tricloroacético
- Ácido gálico (SIGMA)
- Alfa tocoferol (SIGMA)
- BHT (Farmafórmula, Natal, Brasil)
- Kappa - carragenana 1% (Sigma)
- Maxatase (Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil)
- Dextranas de diferentes tamanhos (Farmacia)
- Citrato de sódio, Ferrocianeto de potássio, Cloreto de cálcio, Cloreto de magnésio, Cloreto de ferro e demais reagentes empregados foram de grau analítico.

3.1.4. Equipamentos

Além dos aparelhos usuais de laboratório podemos destacar:

- Agitador orbital mod. 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Banhos e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Bombas peristálticas Microperpex S mod. 2232 da LKB (Bromma, Suécia) e Econo Pump mod. EP-1 da Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA).
- Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col. (1968) (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil).
- Centrífuga refrigerada RC 2-B da Ivan Sorvall Inc. (Norwalk, CO, EUA).
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltd. (Tóquio, Japão).
- Espectrofotômetros Varian - Series 634 da Varian Techtron PPTY Ltd. (Springvale, Vico, Austrália) e Hitachi U-2000 (Tóquio, Japão).
- Espectrômetro de infravermelho modelo FT1 6PC da Perkin Elmer (EUA).
- TG-DTA 60 da SHIMADZU, cadinho de platina.

- Evaporador rotatório Evapo-Mix da Buchler Instruments (Fort Lee, NJ, EUA).
- Coagulômetro (DRAKE, mod. Quick times SP. Brasil)
- Medidor de pH, Orion Research model 701 A/ digital lonalyzer (Cambridge, MA, EUA)
- Balança Analítica Eletrônica, 210 g (0,1 mg). Mod. Fa 2104n - BIOPRECISA
- Coluna Sephadex G-100

3.2. Métodos

3.2.1. Organograma geral

O estudo detalhado da estrutura e atividade de biomoléculas requer o seu isolamento. A partir da obtenção da alga marinha vermelha *Amansia multifida*, foi realizada a primeira etapa desse processo (extração). O composto polissacarídico resultante do processo de extração foi usado para a realização das atividades biológicas e caracterizações químicas como descrito na figura 12.

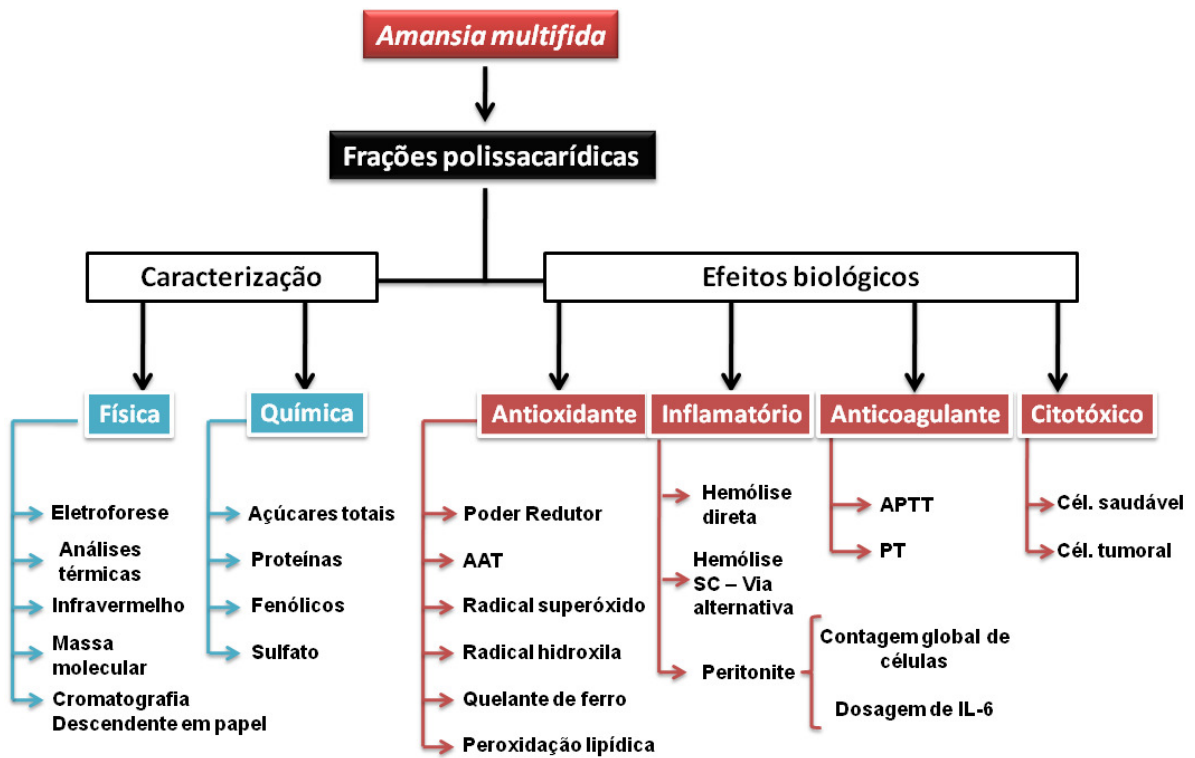


Figura 12: Organograma geral das metodologias empregadas neste trabalho. ATT: Atividade antioxidante total, APTT: Tempo parcial de tromboplastina ativada, PT: Tempo de protrombina, SC: Sistema complemento. IL-6: interleucina-6.

3.2.2. Extração e fracionamento dos polissacarídeos ácidos da alga *Amansia multifida*.

3.2.2.1. Coleta e obtenção do pó cetônico

A alga utilizada neste estudo foi coletada na praia de Búzios (RN) durante a maré baixa (entre 0,0 e 0,2m), e a uma temperatura entre 30-38 °C. Por ser de águas profundas, foi recolhida quando já havia se despreendido do substrato. Em seguida as algas foram catalogadas pela Dra. Heliane Marinho Soriano do Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN. As algas foram levadas ao laboratório, onde foram limpas e secas em estufa a 45°C, depois trituradas e estocadas em frascos de polietileno. Convencionou-se chamar esse triturado seco de pó de algas. Esse pó foi submetido a três delipidações com três volumes de acetona (P.A.) durante 6 h, para retirada de contaminantes lipídicos e polifenólicos. Após este procedimento a acetona foi decantada, e a alga seca a temperatura ambiente, obtendo o que chamamos de pó cetônico (Figura 13).

3.2.2.2. Proteólise e fracionamento

Cerca de 30 g de algas em pó delipidada foi suspenso com 2 volumes de NaCl 0,25 M e o pH ajustado para 8,0 com NaOH. Vinte miligramas de Maxatase, uma protease alcalina de *Esporobacillus* (Biobrás, Montes Claros, MG, Brasil), foram então adicionados à mistura para a digestão proteolítica. Após a incubação por 18 h a 60 °C, sob agitação e ajustes periódicos do pH, a mistura foi filtrada em malha de náilon, obtendo o que chamamos cru de polissacarídeos. A 75% desse cru foi adicionado 1,0 volume de acetona, em banho de gelo, sob suave agitação a 4°C. A solução foi deixada em repouso na mesma temperatura por mais 24 h. O precipitado formado foi coletado por centrifugação a 10.000 g por 10 min, secas à vácuo, obtendo-se a fração F1. Acetona, 2,0 volumes, calculados a partir da solução inicial, foi adicionada ao sobrenadante e precipitada como descrito acima, obtendo a fração F2. Para obtenção da fração total (FT), separou-se 25% do cru de polissacarídeos para posterior precipitação com 6 volumes de acetona, para assim, haver a precipitação de todas as populações polissacarídicas. Três frações foram obtidas e nomeadas de acordo com os volumes de acetona utilizada (F1, F2 e FT). (SILVA, et al., 2005) (Figura 13).

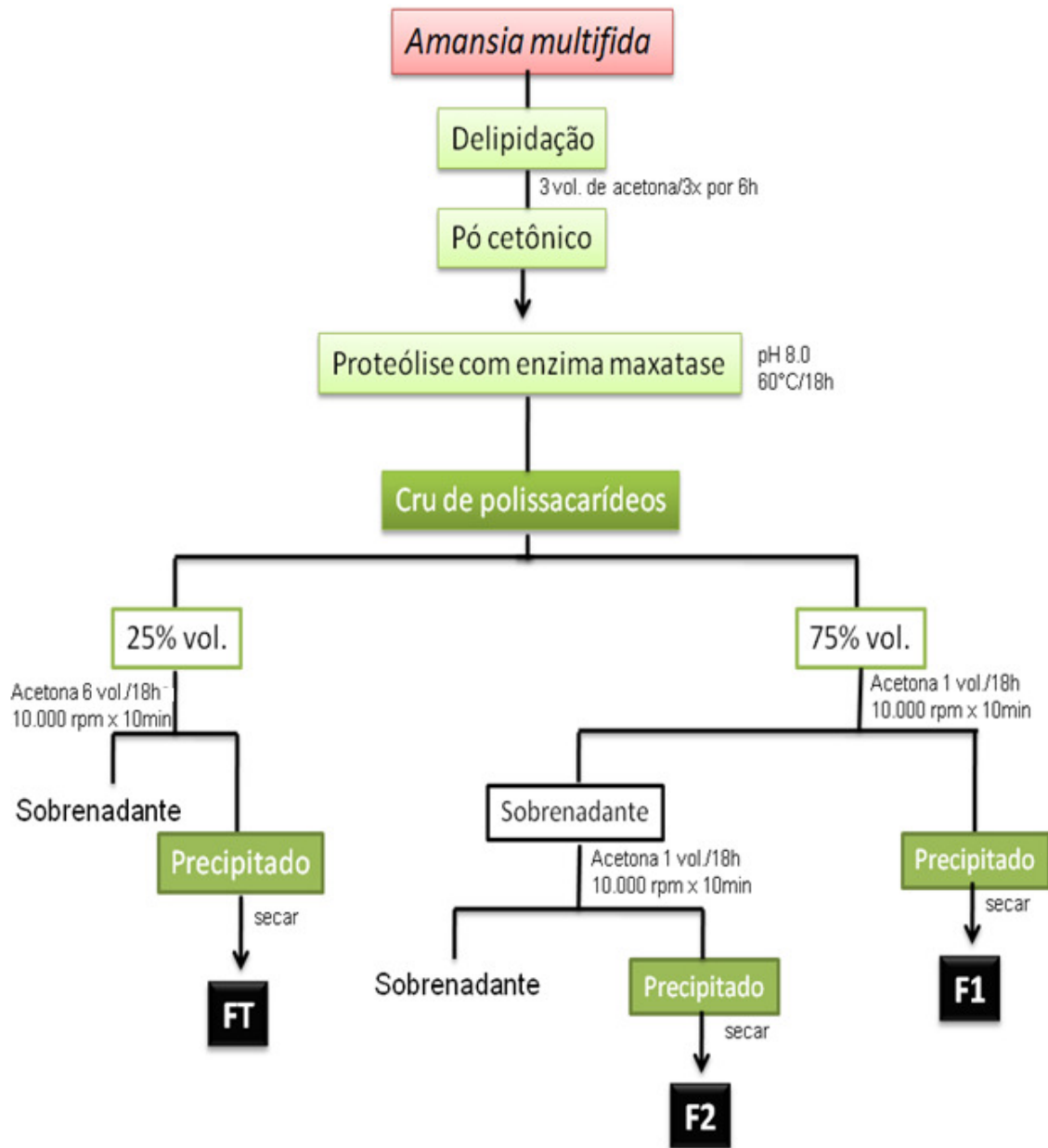


Figura 13. Esquema de obtenção das frações polissacarídicas de *A. multifida*.

3.2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA

3.2.3.1. Eletroforese em gel de agarose

A agarose (0,6%) foi diluída em tampão 1,3 diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 foi colocado sobre lâminas de vidro medindo (7,5x 5,0x 0,2 cm) e (7,5x 10x 0,2 cm) até o resfriamento e formação do gel. Alíquotas de 5 μ L (50 μ g das amostras) foram aplicadas em canaletas no gel e submetidas à eletroforese (5 V/cm durante 1 h), em uma cuba resfriada a 4°C. A origem das aplicações corresponde ao polo negativo (DIETRICH & DIETRICH, 1977). Após o tempo previsto de migração eletroforética para o sistema de tampão PDA, os compostos foram precipitados no gel de agarose pela submersão da lâmina por um tempo mínimo de duas horas, a temperatura ambiente, em CETAVLON 0,1% (brometo de N-cetil-N-N-N-trimetilamônio). Após a precipitação dos polissacarídeos, o gel foi seco sob uma corrente contínua de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1 %, numa solução de ácido acético 1% e etanol 50%, onde o excesso de corante foi removido em solução descorante, uma solução preparada a partir de ácido acético 1% em etanol 50%. A etapa de descoloração do gel de agarose foi então repetida até que o fundo da lâmina descora-se completamente. Em seguida, o gel foi então posto para secar a temperatura ambiente.

3.2.3.2. Análises Térmicas

As curvas termogravimetria (TG), derivada da TG (DrTG) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizados utilizando um Shimadzu 50 H Analisador termogravimétrico (TGA) com um peso da amostra de $7,0 \pm 0,1$ mg. Todos os experimentos foram realizados sob um fluxo de ar, que se manteve a um fluxo constante ou $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, com a amostra sendo aquecida 10-900°C e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. O titular da amostra foi uma platina Pan (DICKENS & FLYNN 1983). Os graus de umidade das amostras foram determinados como as perdas de massa ocorridas enquanto estas eram aquecidas desde a temperatura ambiente até 180°C. Os correspondentes teores de cinzas foram calculados a partir dos valores de massa residual após aquecimento a 580°C. Uma k-carragenana comercial foi usada como padrão.

3.2.3.3. Dosagens químicas

3.2.3.3.1. Açúcares totais

A quantificação dos açúcares totais foi realizada pelo método do fenol/ácido sulfúrico de acordo com DUBOIS e colaboradores (1956), empregando-se como padrão D-galactose como monossacarídeo padrão. As leituras foram realizadas a 490 nm.

3.2.3.3.2. Proteína

O conteúdo de proteína foi determinado com o reagente de Coomassie blue R segundo o método de SPECTOR (1978), e a leitura realizada a 595 nm, empregando-se como padrão albumina de soro bovino.

3.2.3.3.3. Sulfato

O teor de sulfato total foi determinado após hidrólise ácida (HCl 8N, 6 h, 100°C) por turbidimetria pelo método da gelatina-bário (DODGSON, PRICE, 1962). O sulfato de sódio (1,0 mg/mL) foi utilizado como padrão sendo submetido às mesmas condições das amostras em estudo.

3.2.3.3.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com um protocolo semelhante ao de Chandler & Dodds (1993). As frações polissacarídicas (0,2 mL) foram misturado com 0,2 mL de etanol 95%, 1 mL de água destilada e 0,1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu a 50%. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 min e 1 mL de Na₂CO₃ 5% foi adicionada. Por fim, cada amostra foi misturada cuidadosamente e colocados no escuro por 1 h e absorbância foi medida a 725 nm com um espectrofotômetro UV-Vis. A curva padrão de ácido gálico foi obtida para o cálculo do teor de compostos fenólicos.

3.2.3.4. Análise de massa molecular

As frações de polissacarídeos foram submetidas à cromatografia exclusão molecular em Sephadex G-100 (140 × 1cm) com 0,2 M de ácido acético e 0,15 M NaCl como eluente. A eluição foi monitorada pela análise de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956). Para estimar o peso molecular dos polissacarídeos, foram utilizados padrões dextrans de diferentes (Pharmacia).

3.2.3.5. Composição monossacarídica - Cromatografia Descendente em Papel

A cromatografia dos produtos de hidrólise (HCl 4N, 2 h , 100°C) dos extratos foi realizada de acordo como descrito por TREVELYAN (1950) no papel Whatman N°1 utilizando os sistemas de solvente:

- Butanol: Piridina: Água (2:3:1,5) v/v;
- Butanol: Ácido acético: Água (3:1:1) v/v.

Utilizou-se os padrões de monossacarídeos de galactose, xilose, glicose, fucose, ácido glicurônico e manose.

3.2.3.6. Espectroscopia do infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectrofotômetro FT-IR ABB Bomem modelo MB 104, de 4000 a 600 cm^{-1} . As frações polissacarídicas (5 mg) foram analisadas após secagem sob a forma de pastilha de KBr.

3.2.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.2.4.1. Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas de *A. multifida*

O tempo de Tromboplastina parcial ativado (APTT) e Protrombina (PT) para as frações polissacarídicas foram realizados através de kits comerciais. O sangue foi obtido de 10 voluntários sadios que negam o uso de alguma medicação durante

duas semanas antes da coleta, a ingestão de bebidas alcoólicas nos últimos três dias ou fossem fumantes.

Após a coleta, o sangue foi misturado cuidadosamente com citrato de sódio a 3,2% na proporção de 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante e em seguida centrifugado a 3000 g por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e colocado em um tubo plástico siliconizado, obtendo desta forma o **pool** do plasma citratado.

3.2.4.1.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT)

Para a determinação do tempo de Tromboplastina parcial ativada, um *pool* de plasma normal humano citratado (90 µL) foi misturado com 10 µL de uma solução de polissacarídeo e incubado por 3 min a 37°C. Então 100 µL de reagente contendo cefalina líquida ativada com complexo de caolim (DiaMed-Latino América S.A., lab, Brasil) foi adicionado à mistura e incubado por 3 min a 37°C. Posteriormente 100 µL de CaCl₂ 0,02 M foi adicionado e o tempo necessário para a coagulação do plasma foi aferido em um coagulômetro (DRAKE, mod. Quick Times, SP, Brasil). Todos os pontos foram realizados em triplicata.

3.2.4.1.2. Tempo de protrombina (PT)

Para a determinação do tempo de protrombina um *pool* de plasma normal humano citratado (90 µL) foi misturado com 10 µL de uma solução de polissacarídeo e incubado por 3 min a 37°C. Então 200 µL de reagente (Soluplastin, Wiener lab., Argentina) pré-aquecido a 37°C foi adicionado e o tempo necessário para a coagulação do plasma foi aferido em um coagulômetro (DRAKE, mod. Quick Times, SP, Brasil).

3.2.4.2. Atividade antioxidante das frações polissacarídicas de *A. multifida*

3.2.4.2.1. Poder redutor

O poder redutor foi determinado como descrito por Yen e Chen (1995). Resumidamente, 0.2 mL de amostras em diferentes concentrações foram adicionadas em tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) e em seguida misturadas com

0.125 mL de ferricianeto de potássio (1%, w / v), e incubado a 50 °C por 20 min. Posteriormente, 0.125 mL de ácido tricloroacético (TCA) (10%, p / v) foi adicionado à mistura para parar a reação. Então, a solução foi misturada com 1.5 mL de cloreto férrico (0,1%, p / v) e a absorbância foi medida a 700 nm.

3.2.4.2.2. Atividade antioxidante total

Alíquotas de 0,1 mL da solução da amostra (concentração variada de polissacarídeos) foi misturada em um tubo Eppendorf com 1,0 mL da solução reagente (0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM fosfato de sódio e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram fechados e incubados a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, à temperatura ambiente, foi determinada a absorbância a 695 nm. Foi utilizado ácido ascórbico como padrão e a capacidade antioxidante total foram expressos em equivalentes de ácido ascórbico (PRIETO et al. 1999).

3.2.4.2.3. Inibição do radical superóxido

Os radicais superóxidos (ZHOU & ZHENG, 1991) foram gerados em 3 mL de tris-HCl (16 mM, pH 8,0), que continham 78 µM de NADH (forma reduzida), 50 µM de azul de nitrotetrazólio (NBT), 10 µM de Fenazina Metosulfato e concentrações variadas de polissacarídeos. A reação de cor dos radicais superóxidos com NBT foi detectada por monitoramento da absorbância a 560 nm. A capacidade de seqüestro dos polissacarídeos sulfatados do radical superóxido foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Tx. Inib.(\%)} = 1 - (A_{\text{amostra } 560\text{nm}} - A_{\text{branco } 560\text{nm}} / A_{\text{controle } 560\text{nm}}) \times 100$$

A reação que ocorre nesse método está representada na figura 14. Esta reação tem início com a adição de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) à mistura de fenazina metassulfato e NBT, com formação do ânion radical superóxido. Em seguida, dois radicais superóxido são capazes de doar, cada um, um elétron para o NBT, que se reduz a formazana, então monitorada em um comprimento de onda de 560 nm, em espectrofotômetro UV-Vis. Quando algum antioxidante é adicionado no meio, ele é capaz de competir com o NBT pelo ânion radical

superóxido gerado, diminuindo, dessa forma, a redução do NBT e, conseqüentemente, a formação de formazan (OLIVEIRA et al., 2009).

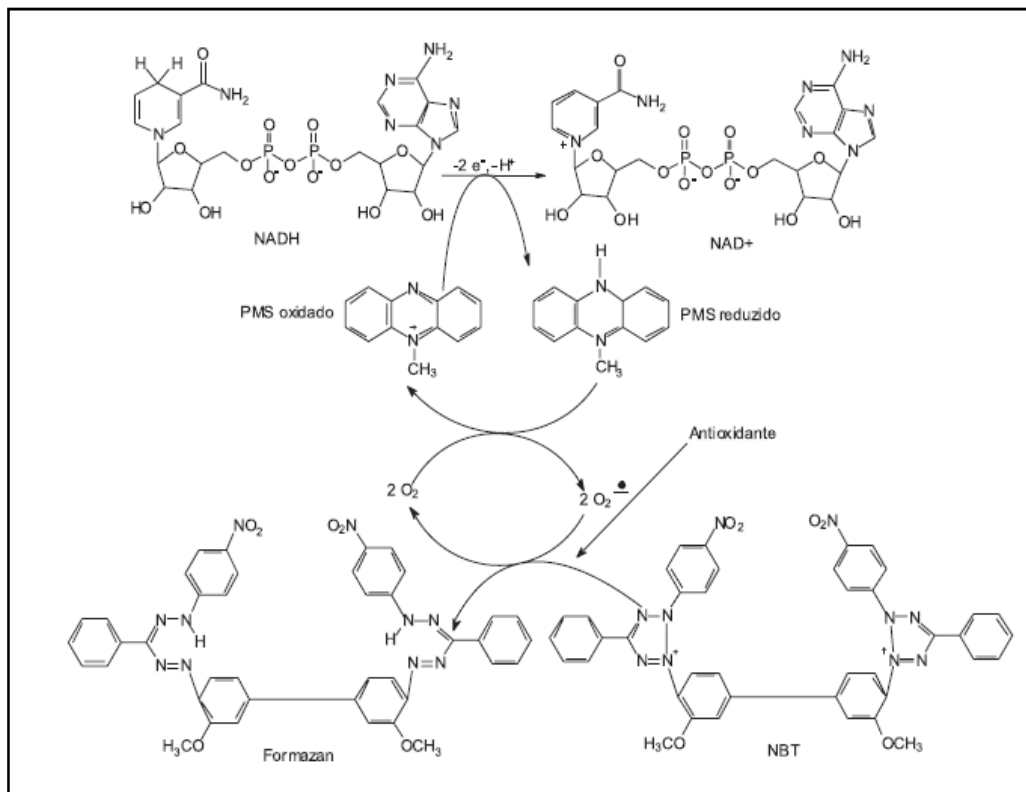


Figura 14. Representação esquemática da geração do ânion radical superóxido e ação de um antioxidante presente no meio. NBT = azul de nitrotetrazólio; PMS: fenazina metassulfato; NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo. Fonte: OLIVEIRA et al., 2009.

3.2.4.2.4. Inibição do radical hidróxila

O efeito na inibição do radical hidroxila foi analisado usando método da deoxirribose, como descrito por Chung, Osawa, & Kawakishi (1997). A reação de mistura continha 450 μ L de tampão fosfato de sódio 0.2 M (pH 7.0). 150 μ L de 2-deoxirribose 10 mM, 50 μ L de FeSO₄-EDTA 10 mM, 150 μ L de H₂O₂ 10 mM, 525 μ L de H₂O, e 75 μ L das soluções polissacarídicas. A reação foi iniciada após adição do H₂O₂. Após incubação a 37 °C por 4 h, a reação foi parada por adição de 750 μ L de TCA a 2.8% e 750 μ L de TBA a 1% em NaOH 50 mM. A solução foi aquecida a 100°C por 10 min. A absorbância da solução foi mensurada a 520 nm. A capacidade de seqüestro dos polissacarídeos sulfatados do radical hidroxila foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Tx. Inib.(\%)} = 1 - \left(\frac{A_{\text{amostra}} 520\text{nm} - A_{\text{branco}} 520\text{nm}}{A_{\text{controle}} 520\text{nm}} \right) \times 100$$

O teste utilizado se baseia na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com produtos da degradação oxidativa da desoxirribose formando adutos coloridos, os quais são detectados espectrofotometricamente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1981). Utiliza-se no ensaio um sistema gerador de ERO's que induzem a ruptura do anel da desoxirribose, formando aldeídos reativos com o TBA. Neste ensaio, utilizamos um sistema pró-oxidante constituído por peróxido de hidrogênio e um complexo de ferro (III), conhecidamente capaz de induzir danos oxidativos típicos em sistemas biológicos (OGINO E OKADA, 1995). O teste da degradação oxidativa da desoxirribose tem sido amplamente utilizado para detectar tanto a formação de radicais hidroxila (GUTTERIDGE E HALLIWELL, 1988), como sequestradores destes radicais (LAUGHTON E COL., 1989; TADOLINI E CABRINI, 1988).

3.2.4.2.5. Ação quelante de ferro

A atividade quelante de Fe^{2+} foi medida conforme relatado por Decker e Welch (1990). Os extratos foram adicionados a um solução de 2 mM $FeCl_2$ (0,1 mL). A reação foi iniciada pela adição de Ferrozine 5 mM (0,2 mL). A mistura foi agitada vigorosamente a temperatura ambiente por 10 min. Após a mistura atinja o equilíbrio, a absorbância foi determinada em 562 nm, os resultados foram obtidos como inibição (GULÇIN et al., 2003).

A geração de HO^\bullet na reação do Fenton é devido à presença de íons de ferro. Alguns compostos inibem a formação de cor no ensaio da desoxirribose, não reagindo com HO^\bullet , mas por quelação do íon ferro e dessa forma, prevenindo a formação da HO^\bullet (MORENO, 2002). Ferrozina pode quantitativamente formar complexos com Fe^{2+} . Na presença de agentes quelantes, a formação do complexo é interrompida, com o resultando no complexo reduzido de cor vermelha. Medição da redução de cor, portanto, permite estimar a atividade quelante da amostra (YAMAGUCHI et al., 2000; GULÇIN et al., 2004).

3.2.4.2.6. Ação na peroxidação lipídica

A inibição da peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação do produto da decomposição de peróxidos lipídicos MDA baseado em reação ao ácido

tiobarbitúrico com gema de ovo como substrato oxidável, como descrito por ZHANG e colaboradores (1997). Resumidamente, 0,5 mL de homogeneizado de ovos (10% em PBS 0,2 M (pH7.4), v/v) e 0,5 mL de amostra foram misturados, em seguida, 0,05 mL de FeSO₄ (0,07 M) foi adicionado para iniciar a peroxidação lipídica. Após a incubação por 30 min., 1,5 mL de TCA a 20% (p/v) e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,8% (p/v) foram adicionados para parar a reação, a mistura resultante foi agitada e aquecida a 100°C por 15 min, e então centrifugado a 3000 g por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi medida em 532 nm (ZHANG et al., 1997). O α -tocoferol foi utilizado como padrão. A inibição da peroxidação lipídica foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Tx. Inib.(\%)} = 1 - (A_{\text{amostra } 532\text{nm}} - A_{\text{branco } 532\text{nm}} - / A_{\text{controle } 532\text{ nm}}) \times 100$$

Esta técnica avalia a oxidação de lípidos do ovo pela formação do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão *beta* dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É volátil, possui baixo peso molecular (C₃H₄O₂, P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco (pKa = 4,46). Em condições apropriadas de incubação (aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO, 1990; BENZIE, 1996). A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos, que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) (Figura 15).

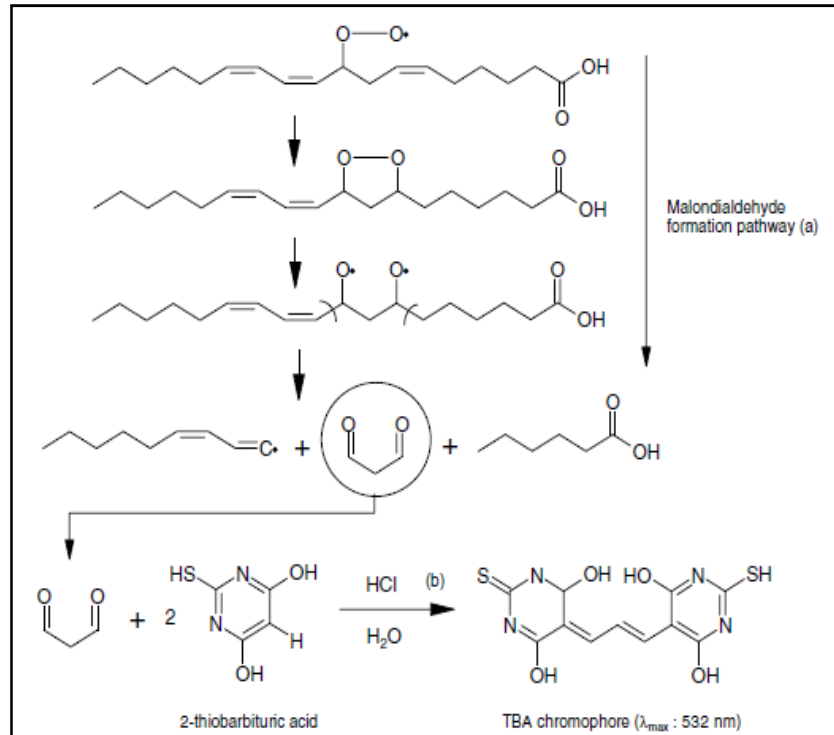


Figura 15. Via de formação do Malonaldeído a partir do radical peróxido do ácido graxo triinsaturado.e formação do cromógeno TBA. FONTE: LAGUERRE, LECOMTE, E VILLENEUVE, 2007.

3.2.4.3. Atividade inflamatória, via hemólise, das frações polissacarídicas de *A. multifida*

3.2.4.3.1. Hemólise direta

Os ensaios de hemólise foram conduzidos de acordo com procedimento descrito por Belokoneva e colaboradores (2003). Resumidamente, 250 µL de 10% (v / v) de suspensão de eritrócitos foram incubadas sob agitação à temperatura ambiente durante 1 h com 5 µL de amostras. As misturas foram centrifugadas em temperatura ambiente por 5 min a 10.000 × g e a absorbância do sobrenadante foi medida em 550nm com uma leitora de placa. As frações foram testadas em triplicata uma massa final de 50 µg. Triton X-100 1% (v / v) foi usado como um controle positivo (100% de lise dos eritrócitos) e PBS como controle negativo (0% de lise dos eritrócitos). A porcentagem de lise dos eritrócitos (H%) foi determinado da seguinte forma: $H = [1 - (OD_{550\text{ nm}} \text{ amostra} - OD_{550\text{ nm}} \text{ PBS}) / (OD_{550\text{ nm}} \text{ Triton X-100 1\%} - OD_{550\text{ nm}} \text{ PBS})] \times 100$. Os resultados foram expressos como média ± SD.

3.2.4.3.2. Hemólise pela via alternativa do sistema complemento

3.2.4.3.2.1. O Soro

Após a coleta, o sangue foi deixado em repouso durante 45 min em gelo para a retração do coágulo. Os soros foram separados por centrifugação a 2.500 RPM por 15 min a temperatura ambiente. O sobrenadante de cada doador foi aspirado e colocado em tubos falcon separadamente e acondicionados a 0°C. Posteriormente, estes soros foram descongelados e volumes iguais de cada, foram misturados em tubos plásticos, em gelo, obtendo-se assim o pool qual foi estocado a 0°C. Para a utilização nos ensaios funcionais do sistema complemento as alíquotas de pool foram descongeladas imediatamente antes do experimento, sendo utilizada uma única vez com esse fim.

3.2.4.3.2.2. Ativação da via alternativa

Para a verificação da via alternativa do complemento, foi usados eritrócitos de coelho que ativam a via independente de anticorpos específicos (PLATTTS-MILLS & ISHIZAKA 1974). Os eritrócitos não sensibilizados foram diluídos em tampão salina fosfato pH 7.4 contendo 0,15 M de NaCl a uma concentração de 5×10^7 Células/ mL. A reação de ativação foi realizada de acordo com (ADACHI et al., 1990) com algumas modificações. Para o ensaio, amostras foram dissolvidas em salina (NaCl 0,85%, NaHCO₃ 0,01 mM, pH 7,37 ° C.). 50 µL de uma solução contendo polissacarídeos ou salina 0,9% (hemólise provocada pelas proteínas do soro – hemólise natural) foram misturados com 50 µL de tampão venoral (controle- 50% hemólise) e foram incubados com 150 µL de soro (*pool*) por 1 hora a 37 °C. Após esse tempo, essa mistura foi diluída com 150 µL de tampão venoral acrescido de EGTA a 0.05 M e Mg²⁺ a 0,01M (EGTA-GVB- Mg²⁺). A solução (400 µL) foi misturada com 100 µL de eritrócitos de coelho a 5×10^7 células/mL e novamente incubada por 1 h a 37°C. Passado esse período, 1 mL de tampão venoral- EDTA a temperatura de 0-4°C foi adicionada para parar a reação. Logo após, os tubos foram centrifugados a 2500 g por 10 min, e a absorbância do sobrenadante foi mensurada a 414 nm. O controle 100% hemólise foi obtido com a adição de 1,35 mL de água

destilada a 100 µL de eritrócitos de coelho a 5×10^7 células/mL, sendo também centrifugado e a leitura do sobrenadante feita a 414 nm. Para o branco da reação foi usada solução salina 0,9%.

3.2.4.4. Peritonite aguda em camundongos

A peritonite aguda foi induzida com uma injeção intraperitoneal (i.p) das amostras em um volume de 0,5 mL em camundongos *swiss*, pesando entre 25-30 g. Após 3 h os animais foram eutanasiados, de acordo com o método de eutanásia descrito abaixo, e as cavidades peritoneais foram lavadas com 5 mL de PBS gelado. O número de leucócitos totais presente no fluído foi contado em câmara de Neubauer, após diluição com Turk. Uma parte do lavado foi centrifugado a 1100 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi congelado a 20°C para posterior dosagem de citocinas. O ensaio foi realizado em quatro grupos (n=4), totalizando 16 animais.

- Controle negativo: solução salina 0,9%
- Controle positivo: kappa carragenana comercial (Sigma) 25 mg/kg de peso corporal
- Fração FT a 25 mg/kg de peso corporal
- Fração FT a 50 mg/kg de peso corporal

O método de eutanásia utilizado foi o deslocamento cervical, onde previamente foi administrada uma superdose de tiopental (50 mg/kg) via subcutânea em cada animal. Não foi possível administração intraperitoneal do tiopental, pois poderia influenciar de alguma forma as análises, uma vez que se utiliza o lavado peritoneal para os ensaios subseqüentes. O destino final dos animais foi de responsabilidade de uma empresa especializada, onde antes, estes são estocados em freezer adequado para armazenamento de animais. Esse trabalho foi aprovado pela comissão de ética de uso de animais da UFRN, sob o protocolo de número 048/2009 (documento em anexo).

3.2.4.4.1. Dosagem de interleucina 6 (IL-6)

As concentrações de IL-6 no lavado peritoneal foram determinadas pela técnica de ELISA sanduíche, com a utilização *kits* comerciais da BD Biosciences (San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Nessa técnica, um anticorpo monoclonal específico é adsorvido a uma matriz sólida, uma placa de 96 poços. Após adição da amostra (lavado peritoneal) na qual se encontra o antígeno (IL-6) a ser dosado, procede-se à incubação da placa, ocasião em que as moléculas de antígenos se fixarão aos anticorpos adsorvidos. Por meio de lavagem, todo o material não-fixado é eliminado. A seguir adiciona-se um segundo anticorpo, específico para o antígeno, o qual possui uma enzima ligada. Nova lavagem é realizada para a remoção dos anticorpos não-ligados e acrescenta-se então o substrato da enzima ligada e um cromógeno; este último funciona como revelador da reação da enzima-substrato e a intensidade da coloração mostrada pelo cromógeno será proporcional a concentração do anticorpo secundário e, portanto, proporcional a quantidade de antígeno, IL-6. As absorbâncias das amostras são lidas em leitora de placas usando filtro de 450 nm e comparadas às leituras de uma curva padrão, obtida com concentrações conhecidas de IL-6 recombinante.

3.2.5. Avaliação da citotoxicidade das frações polissacarídicas de *A. multifida*

O efeito citotóxico das frações polissacarídicas deste estudo foi avaliado usando-se o método descrito por MOSMANN (1983). Este ensaio é baseado na transformação e quantificação do MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difenil-tetrazolio]. Os elétrons da cadeia respiratória reduzem o MTT gerando cristais de formazan, que insolúveis em água e de cor violeta, no interior das células (figura 16). A quantidade desses cristais pode ser determinada espectrofotometricamente e serve para estimar o número de mitocôndrias e, portanto, o número de células vivas na amostra.

Células HeLa (células de câncer cervical) e 3T3 (Células de fibroblastos de camundongos) foram cultivadas em meio demem. As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1×10^6 células/ poço e incubados com as frações polissacarídicas (25 μ g – 100 μ g) a 37°C, 5% de CO₂, ao tempo de 24 e 48

h. Ao final da incubação foi adicionado 10 μ L of 12 mM 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), e incubado por 4 h a 37°C, 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado 100 μ L ácido isopropanol 0,04N aos poços e misturado cuidadosamente para dissolver os cristais de formazan azul-escuro com leitura a 570 nm. (MOSMANN, 1983).

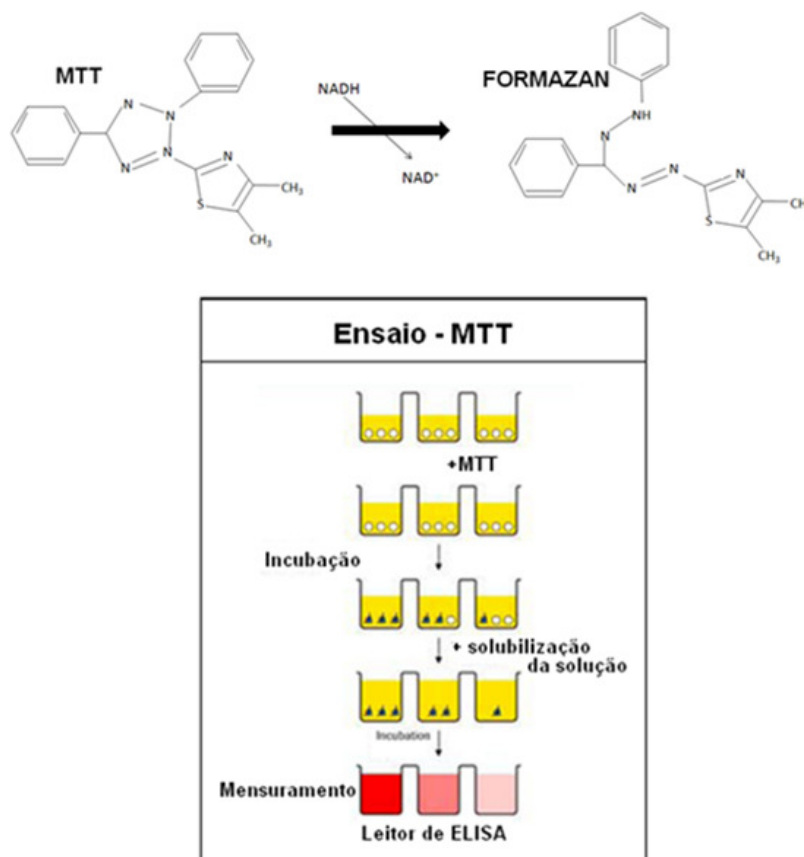


Figura 16. Esquema da metodologia do ensaio de citotoxicidade por MTT, com a formação de formazan pelas células viáveis. Fonte: ROCHE APPLIED SCIENCE, 2008.

3.2.7. Análise estatística

Para a análise estatística dos efeitos biológico dos polissacarídeos foi usada a Análise de variância (ANOVA) com nível de significância de $p < 0,05$. O Teste de Turkey-Kramer, foi utilizado para determinar que existem diferenças entre os valores obtidos em relação aos grupos denominados controle e experimental (comparações múltiplas) com níveis de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Rendimento das frações polissacarídicas

Após o processo de extração e fracionamento foram obtidas as frações polissacarídicas FT, F1 e F2 da alga *A. multifida* com rendimentos de 32,09, 35,44 e 32.45%, respectivamente (Fig. 17).

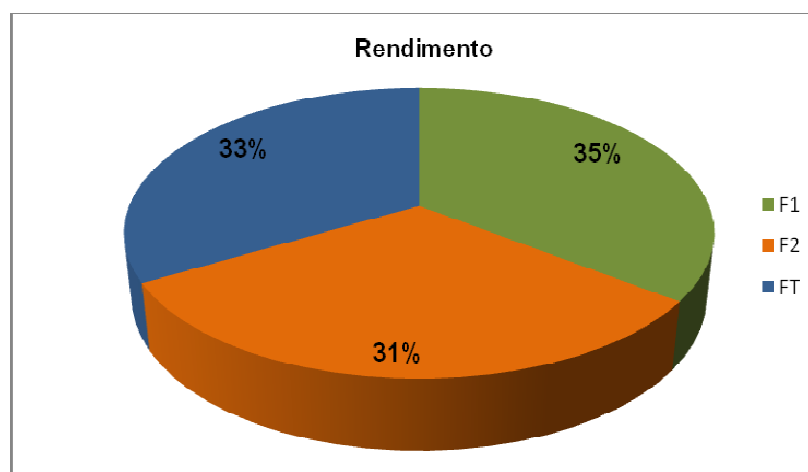


Figura 17. Rendimento das frações polissacarídicas obtidas da alga vermelha *Amansia multifida*.

4.2. Caracterização física e química

4.2.1. Eletroforese em gel de agarose

Os resultados de eletroforese em gel de agarose e tampão 1,3 diamonopropanoacetato e coloração com azul de toluidina, mostraram que os polissacarídeos de *Amansia multifida* são do tipo sulfatados em função da metacromasia. Esses carboidratos apresentaram certa polidispersividade, comuns em carboidratos complexos de algas e diferentes migrações eletroforéticas. As migrações de cada fração polissacarídica podem ser evidenciadas na Figura 18.

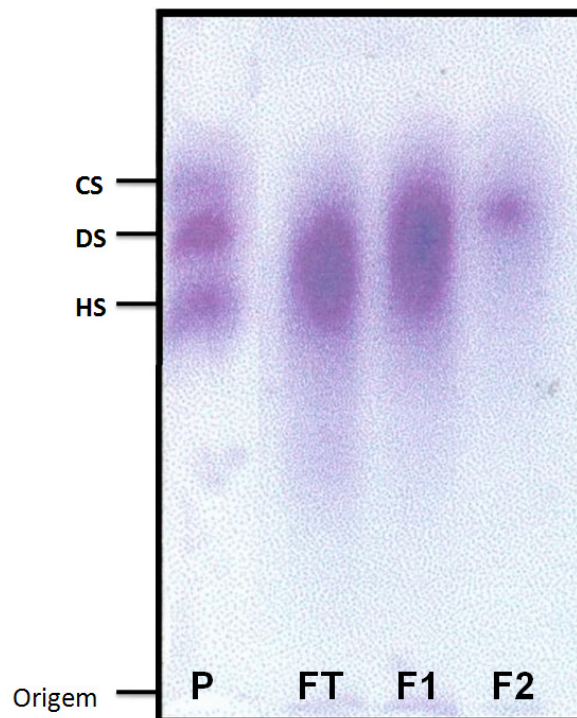


Figura 18. Perfil eletroforético das frações polissacarídicas da alga *Amansia multifida*. CS: Condroitin sulfato, HS: Heparan Sulfato, DS: Dermatan sulfato, P: padrão.

4.2.2. Análises térmicas

As Frações de *A. multifida* foram submetidas à análise térmica por TG/DTG. A Figura 19 mostra o perfil de degradação das três frações. A primeira perda foi associada à evaporação da água, dessa forma, foi mensurado o teor de umidade de cada amostra, apresentando valores de 7,75% (FT), 8,2% (F1), 16% (F2) e 18,3% (κ -carragenana) (tabela 03). Até 560°C ocorreu toda decomposição da matéria orgânica, restando então, o material inorgânico que era composto por minerais (cinzas). A fração F2 apresentou maior teor de cinzas com 54%, enquanto a F1 apresentou a menor quantidade, com 21,7%, e a fração FT mostrou valor intermediário às demais frações, apresentando 38,7% de cinzas do seu peso total (Figura 20). A κ -carragenana apresentou valores de cinzas de 30%.

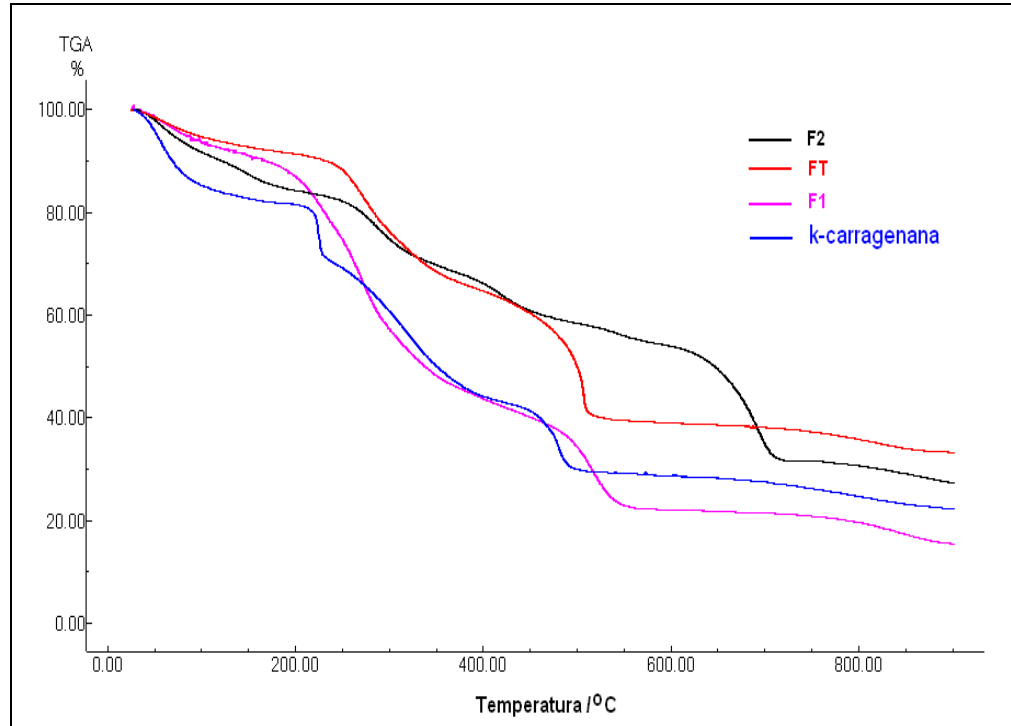


Figura 19. Perfil de degradação termogravimétrica das três frações de *A. multifida*, utilizando atmosfera de ar.

A figura 20 mostra a relação entre o teor de matéria orgânica e inorgânica das frações de *A. multifida*. Pode-se destacar ainda, que a fração F1 apresentou maior proporção de matéria orgânica, com 79%, seguido da FT com 61,3% e da F2 com apenas 46%. A κ -carragenana padrão apresentou 70% de matéria orgânica..

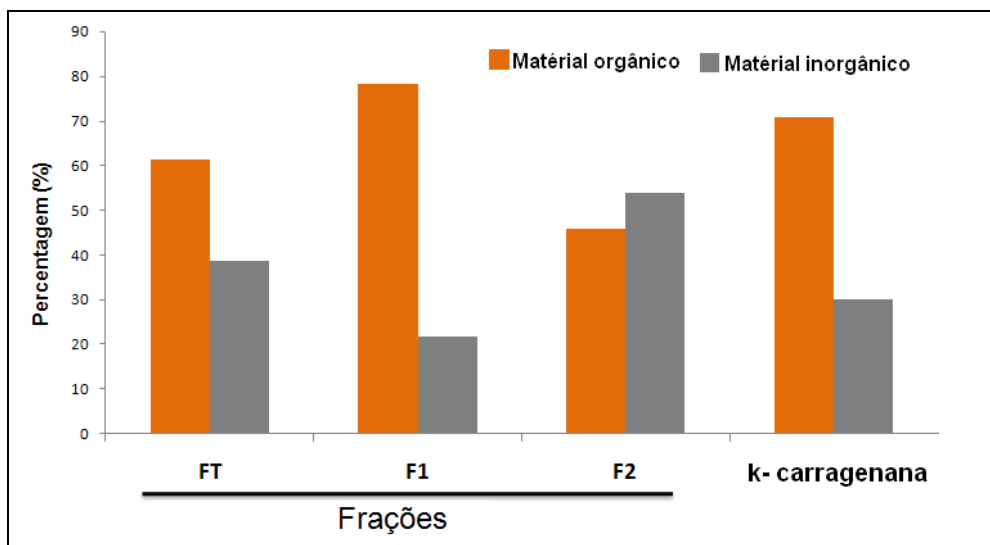


Figura 20. Teores de matéria orgânica e inorgânica das três frações de *A. multifida* analisadas por termogravimetria.

Pode-se observar na figura 21 que todas as frações obtiveram de forma geral quatro perdas de massa. A primeira corresponde a evaporação da água (entre

~36 e 168 °C) (tabela 3). O segundo pico observado na DrTG correspondeu a degradação dos polissacarídeos presentes nas frações. Todas as frações apresentaram a segunda degradação em valores de temperatura próximos (T_m entre 271 e 287 °C). Na κ -carragenana, a segunda degradação foi em temperatura pouco inferior (226 °C). A área do pico na DrTG foi proporcional a quantidade de moléculas que foram degradadas a uma determinada temperatura. Então, o teor de carboidratos (TC) nas amostras apresenta-se da seguinte forma: $TCF1 > TCFT > TCF2$ (Figura 21).

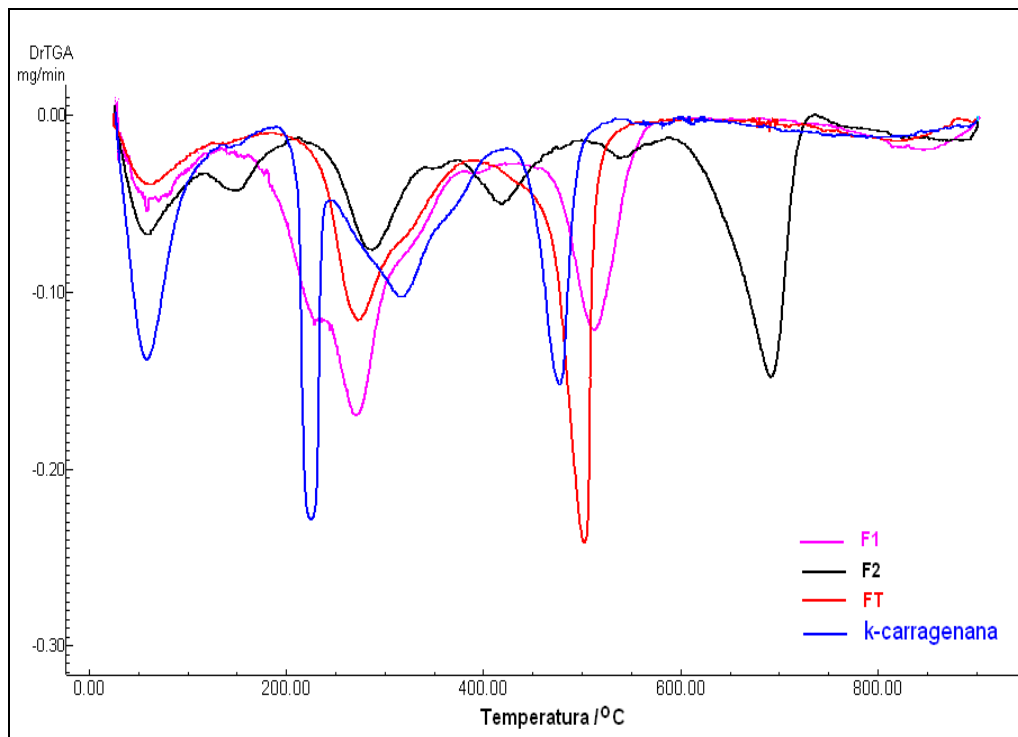


Figura 21. Perfil de degradação termogravimétrica, analisado pela derivada da TG das três frações de *A. multifida*, utilizando atmosfera de ar.

A terceira decomposição foi relacionada a produtos estáveis da pirólise dos polissacarídeos (SILVA et al., 1998). Nesta, houve picos em 502 °C (FT) e 512 °C (F1). Na fração F2 e κ -carragenana a terceira fase de degradação ocorreu em duas temperaturas de 419 °C-536 °C e 317 °C-478 °C, respectivamente, com pequenas perdas de massa (tabela 3). Além disso, apareceu um quarto e grande pico de degradação (695 °C) na fração F2, sendo em temperatura acima de 560 °C, não estando relacionado com compostos orgânicos, como podem ser observados na Figura 22 e Tabela 3. Pela DrTG podemos observar última degradação que ocorreu

em todas as amostras em temperatura máxima entre 817°C e 892°C (tabela 3), esse pico está relacionado a degradação dos carbonatos e formação de óxidos.

Tabela 3. Análise térmica por termogravimetria das frações polissacarídicas de *A. multifida*, de acordo com a ordem de degradação, com aquecimento de 0 a 900°C, vazão de 10°C/min em atmosfera de oxigênio.

Ordem de degradação	Variáveis	Frações			
		FT	F1	F2	K- carrag.
1° Degradação	$T_{início}$ (°C)	38	36	39	33
	T_m (°C)	60	61	58	59
	T_{fim} (°C)	168	134	125	100
	Perda de massa (%)	7,75	8,3	16	18,3
2° Degradação	$T_{início}$ (°C)	231	189	240	212
	T_m (°C)	272	271	287	226
	T_{fim} (°C)	372	367	370	235
	Perda de massa (%)	26,9	50	17,0	10,8
3° Degradação	$T_{início}$ (°C)	397	484	355/500	343/445
	T_m (°C)	502	512	419/536	317/478
	T_{fim} (°C)	513	547	489/601	403/494
	Perda de massa (%)	26,5	20	12,7	41,5
4° Degradação	$T_{início}$ (°C)	710	769	779	599
	T_m (°C)	817	844	873	892
	T_{fim} (°C)	877	895	891	877
	Perda de massa (%)	5,3	6,5	4,3	7

T_m : Temperatura máxima da reação; $T_{início}$: temperatura do início da reação; T_{fim} : temperatura do final da reação. Todas as temperaturas foram expressas em graus Celsius (°C).

De acordo com a análise de DTA, em todas as amostras, a primeira perda de massa apresentou um pico endotérmico (pico para baixo), relacionado com a desidratação do material. A segunda perda de massa é referente a degradação dos

polissacarídeos, o qual apresentou uma reação do tipo exotérmica (pico para cima), indicando a ocorrência de uma reação de oxidação (por um gás) (CANOTILHO et al., 1992). A terceira degradação, também acompanha o comportamento da segunda. Note que o pico grande em 695 °C da fração F2 apresentou perfil diferente, não tratando de perda de massa de polissacarídeos (figura 21 e 22).

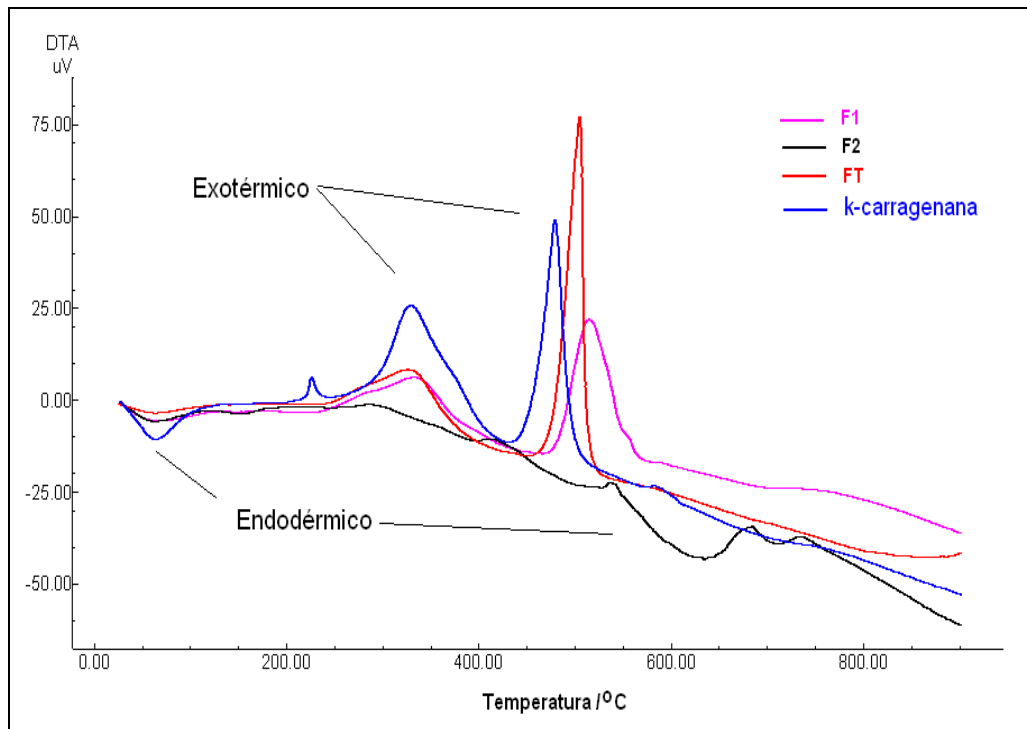


Figura 22. Análise térmica diferencial (DTA) das três frações de *A. multifida*, utilizando atmosfera de ar. Pico para cima: reação exotérmica. Pico para baixo: reação endotérmica.

4.2.3. Dosagens químicas

As análises químicas para as três frações polissacarídicas da alga vermelha *A. multifida* (Tabela 4) foram calculadas utilizando-se as dosagens químicas e análise termogravimétrica. Esta tabela mostrou que F1 apresentou maior teor de açúcares totais, 57,1%, seguido da FT com 50,9% e F2 apresentando menor teor, com apenas 28,7%. Os compostos fenólicos e proteínas, considerados contaminantes na amostra, apresentaram baixas proporções nas três frações, com valores de proteínas de 0,61% (F1), 1,89% (FT) e 2,2% (F2). Todas as amostras apresentaram quantidade menor ou igual a 0,1% de compostos fenólicos. O teor de umidade não ultrapassou 16% com relação ao peso total da amostra.

Após a degradação térmica dos constituintes orgânicos, o sulfato se apresenta na forma de cinzas junto com outras substâncias, como carbonatos e óxidos. O teor de sulfato, como mostrado na tabela 4, apresentou um alto teor de sulfato para FT (19,6%) seguido da fração F2 (18%) e F1 (4,6%).

Tabela 4. Percentual dos constituintes orgânicos (açúcares totais, compostos fenólicos, proteína) e cinzas (sulfatos, carbonatos, óxidos, cloretos, fosfatos, fluoretos) das frações polissacarídicas da alga vermelha *Amansia multifida*, calculado em relação ao peso. nd: não determinado.

Frações	Compostos orgânicos			Cinzas		Umidade	
	^a Açúcares totais (%)	^b Compostos fenólicos (%)	^c Proteínas (%)	^d Sulfato	^e Carbonato	^e Óxidos ^e Cloretos ^e Fosfatos ^e Outros	^e Umidade
FT	50,9 ±2,10	0,1±0,005	1,89±0,2	19,6±1	5,3	13,9	7,7
F1	57,1±2,39	0,04±0,01	0,61±0,5	4,6±2,1	6,5	10,6	8,2
F2	28,4±1,73	0,02±0,01	2,2±0,1	18±1,2	4,3	31,7	16
K- carrag.	60,26±0,1 ^f	nd	0,2±0,09 ^f	17,8±1 ^f	7,0	23,0	18,3

- a- DUBOIS et al. (1956)
- b- CHANDLER & DODDS (1993)
- c- SPECTOR (1978)
- d- DODGSON, PRICE (1962)
- e- Termogravimetria (TG)
- f- Dados de SILVA et al. (2010)

O valor restante das cinzas foi considerado como óxidos (produto da degradação dos carbonatos), cloretos, fosfatos e outros sais (tabela 4). Assim, a proporção do conjunto desses sais apresentou valores de 13,9% para FT, 10,6% para F1 e 31,7% para F2. Estudo Realizado por SILVA e col.. (2010), mostrou que uma k-carragenana comercial apresentou valores em torno de 60% e 17,8% de açúcares totais e sulfato, respectivamente.

4.2.4. Análise da massa molecular

A análise de massa molecular mostra que a fração FT era composta, principalmente, de polissacarídeos com massa molecular em torno de 147 kDa, apresentando-se parcialmente homogêneo. A fração F1 apresentou polissacarídeos concentrados em duas massas moleculares, uma com 31 kDa (variando entre 18 e

38 kDa) e outra com massa molecular pouco maior que 150 kDa. A fração F2 apresentou duas populações polissacarídicas, ambas com a massa molecular entre 150-1000 kDa. (figura 23)

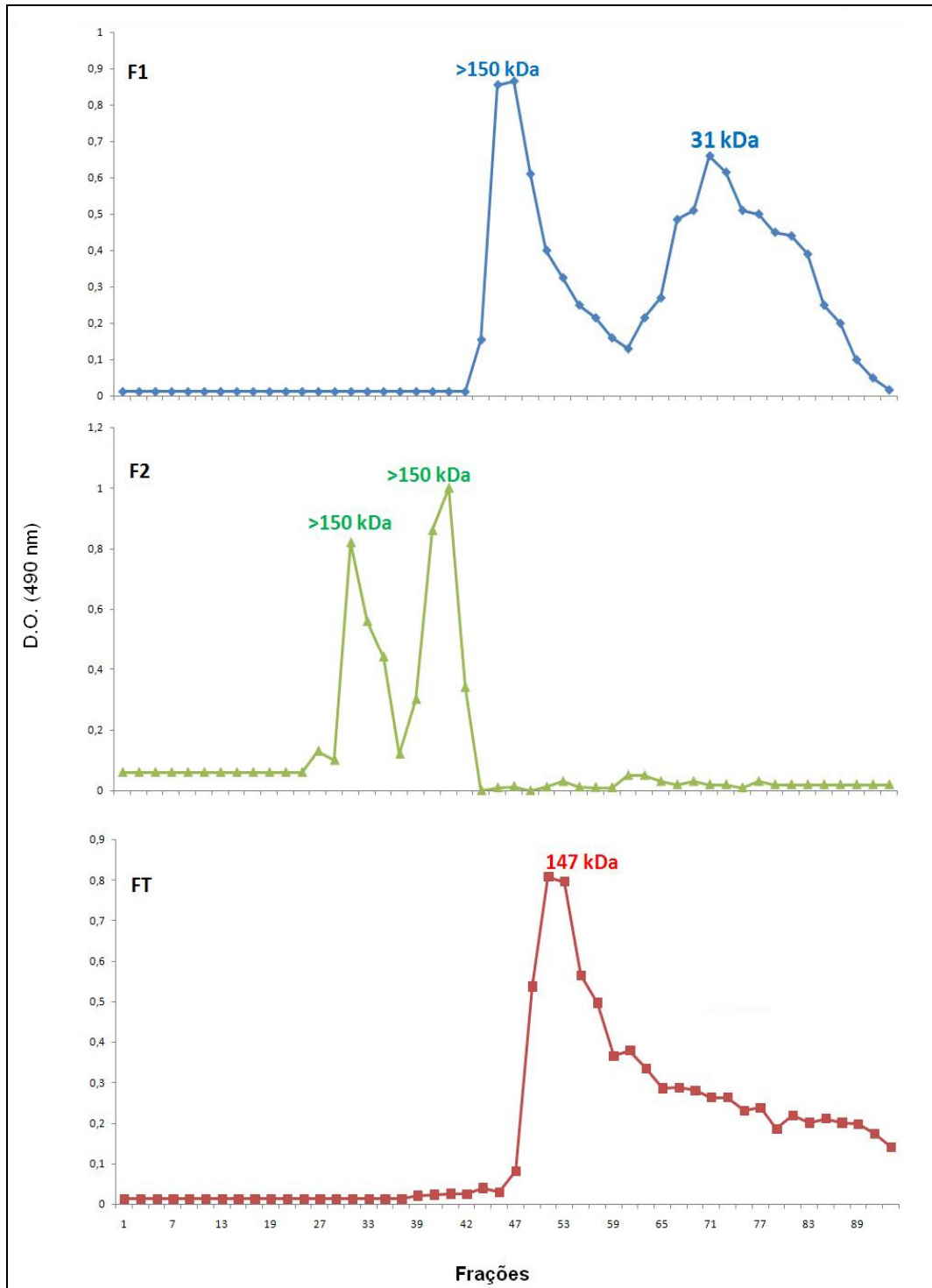


Figura 23. Perfil de eluição das frações polissacarídicas alga *A. multifida*, quando submetida a cromatografia de exclusão molecular, utilizando coluna sephadex G-100.

4.2.5. Composição monossacarídica por cromatografia descendente em papel (CDP)

A figura 24 mostra o perfil das frações na CDP, onde podemos evidenciar a forte presença de galactose, glicose, xilose, manose e ácido glicurônico nas frações monossacarídicas da alga em estudo.

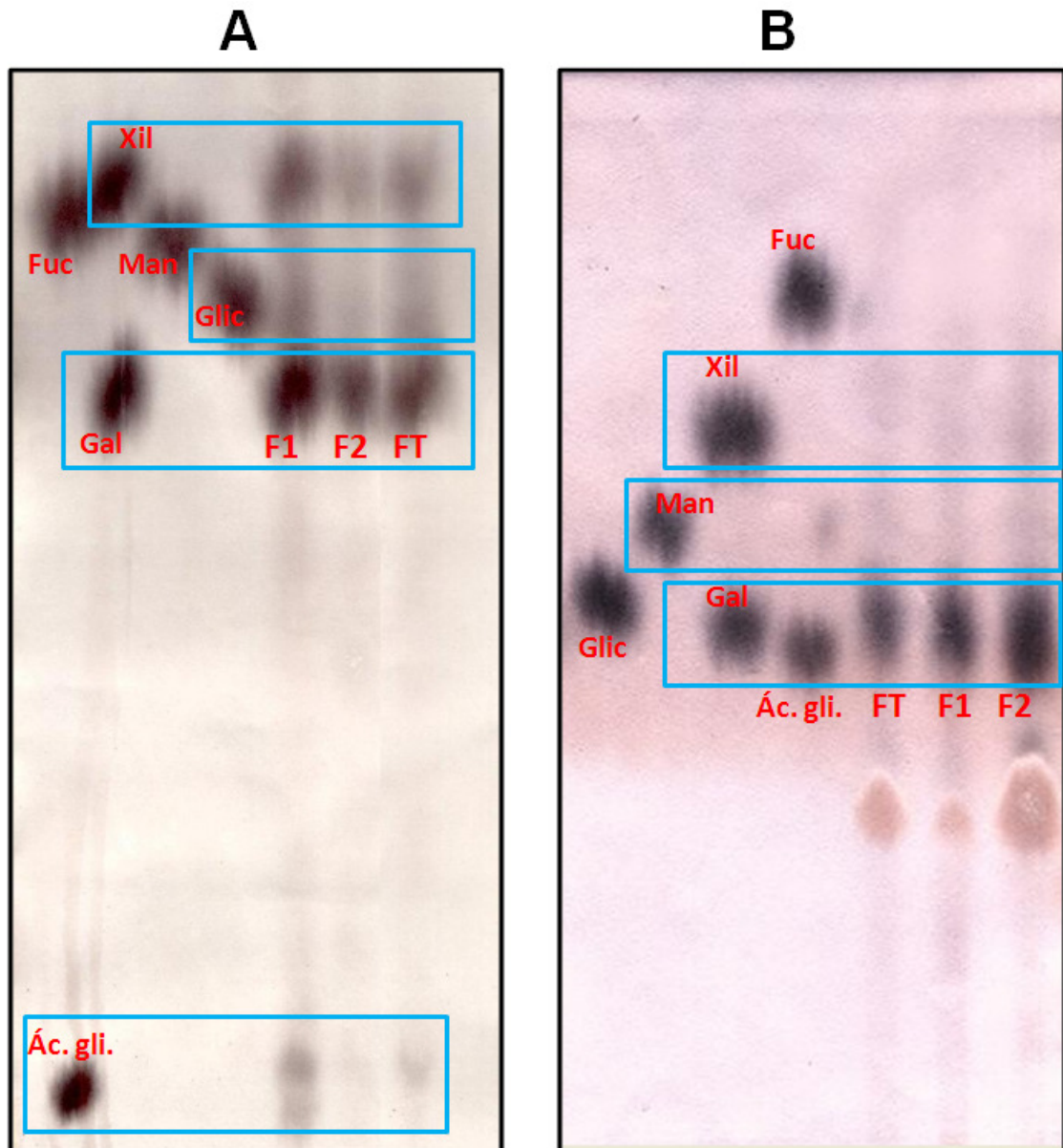


Figura 24. Perfil cromatográfico dos hidrolisados das frações polissacarídicas de *A. multifida*, utilizando o sistema de solvente, (A) Butanol: piridina:água (2:3:1,5 v/v) e (B) Butanol: ácido acético:água (3:1:1 v/v). Fuc: fucose, Man: manose, Gal: galactose, Xil: xilose e Ác. gli.: ácido glicurônico.

A tabela 5 mostra os valores de razão molar dos monossacarídeos analisados por cromatografia descendente em papel (CDP), e submetidos à densitometria nas três frações polissacarídicas da alga *A. multifida*, levando em consideração o cromatograma da figura 24A. Todas as frações apresentaram maiores teores de galactose como carboidrato. A fração F1 apresenta uma proporção de 0,49 de glicose; 0,63 de xilose e 0,32 de ácido glicurônico para cada molécula de galactose. A fração F2 mostrou valores de 0,33 de glicose; 0,48 de xilose e 0,09 de ácido glicurônico para cada molécula de galactose. Já na fração FT não foi observada a presença de ácido glicurônico, apresentando proporções de 0,45 de glicose e 0,59 de xilose para cada molécula de galactose.

Tabela 5. Composição monossacarídica e razão molar (por densitometria) das frações polissacarídicas da alga vermelha *A. multifida*

Frações	Razão molar				
	Galactose	Glicose	Xilose	Ácido glicurônico	Manose
F1	1	0,49	0,63	0,32	nd
F2	1	0,33	0,48	0,09	nd
FT	1	0,45	0,59	-	nd

. nd: não determinado

Através da densitometria do cromatograma (levando em consideração ter sido utilizado a mesma massa em todas as frações), pode-se também constatar que os teores de carboidratos ocorrem na seguinte proporção: TCF1>TCFT>TCF2. Uma vez que levando-se em consideração uma mistura das três frações, constatou-se então 43,64% de carboidratos na fração F1, 30,66% na fração FT e 25,7% na F2.

4.2.6. Espectroscopia do infravermelho

A figura 25 mostra os espectros na região de 4000-600 cm^{-1} comprovando três frações polissacarídicas extraídas da alga vermelha *A. multifida*. Todos os espectros mostraram perfis típicos de carboidratos.

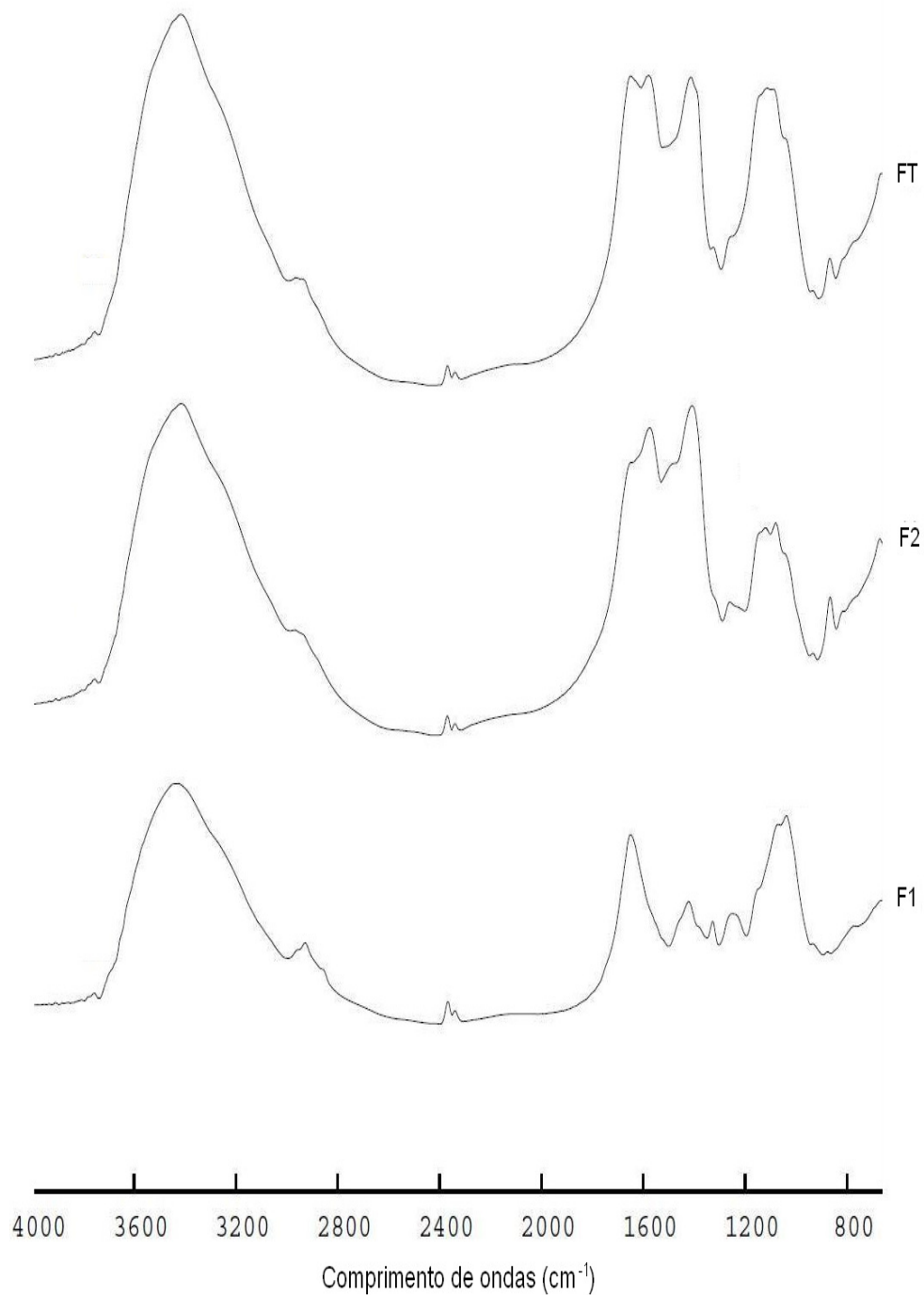


Figura 25. Espectros do infravermelho ($4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$) das frações polissacarídicas da alga vermelha *A. multifida*.

As frações estudadas apresentaram bandas características de grupos sulfato em $1240\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ referentes as deformações axiais da ligação S=O e em 867 cm^{-1} associado a deformação angular da ligação C–O–SO₄ em C₆ da galactose, sendo esta última ausente na fração F1 (Figura 25 e Tabela 6). O grupo hidroxila nas estruturas dos monossacarídeos foi evidenciada na deformação axial 3340 cm^{-1} para todas as frações. A deformação axial C-H foi encontrado para a fração F1 e o grupo

C-O de ácido urônico com pico forte em 1630 cm^{-1} para fração F1 e um ombro para F2 (Tabela 6).

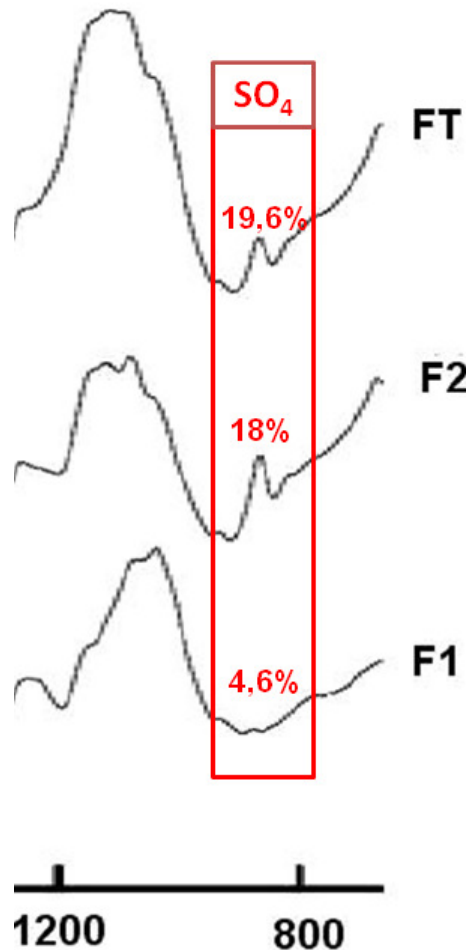


Figura 26. Espectros do infravermelho ($1300 - 600\text{ cm}^{-1}$) das frações polissacarídicas da alga vermelha *A. multifida*.

A figura 26 trata-se de uma expansão da região entre $1300 - 600\text{ cm}^{-1}$, onde podemos observar certa similaridade entre as frações, exceto a pico 867 cm^{-1} (referente ao grupo sulfato da galactose) que está quase ausente na fração F1, o que corrobora com os dados encontrados na dosagem de sulfato, onde esta fração apresentou baixa quantidade.

Tabela 6. Comprimentos de ondas e seus respectivos grupos funcionais encontrados nas frações polissacarídicas da alga vermelha *A. multifida*.

Comprimento de ondas (cm ⁻¹)	grupo(s)	Frações			Ref.
		FT	F1	F2	
867	Deformação angular de C–O–SO ₄ em C ₆ da galactose	++	+	++	A
1240–1260	Deformação axial de S=O de ésteres sulfato	+	++	++	A
1630-1650	Deformação axial de C-O de ácido urônicos	-	+++	s	B
2926	Deformação axial de C-H	s	+	s	C
3440	Deformação axial de O-H	+++	+++	+++	D

-, ausente; +, pequeno; ++, médio; +++, forte; s, ombro de pico

A – PEREIRA et al., 2009

B – MANUEL et al., 1998, ZHANG et al., 2010.

C – LIU CHUN-HUI et al., 2007

D - SEKKAL, LEGRAND, 1993.

4.2. Atividades biológicas

4.2.1. Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas da alga *A. multifida*.

O teste de APTT tem por finalidade avaliar o tempo de coagulação pela via intrínseca. Os resultados do teste de APTT (tabela 7) mostraram que a heparina (padrão) apresentou alta atividade em todas as massas testadas (>240 s) (p<0.001). A fração FT (50 µg) apresentou um efeito anticoagulante de 51,1 s, próximo ao dobro observado no controle (p<0.001) e mantendo-se praticamente constante até 150 µg (48,3 s) pelo teste de APTT (p<0.001). O alto efeito anticoagulante da fração FT foi encontrado com 200 µg (>240 s) (p<0.001). A fração F1 mostrou atividade com 50 µg (60,1 s), havendo uma baixa diminuição com 200 µg (48,1 s), ambas foram significativas (p<0,001). A fração F2 a 50 µg apresentou efeito similar a FT na mesma dose (53,3 s). Outra maneira de se avaliar a ação anticoagulante de moléculas é pelo ensaio de PT, que tem por finalidade avaliar a coagulação pela via extrínseca. No entanto, nenhuma fração polissacarídica obteve atividade neste

teste, nas concentrações entre 50-200 μg (tabela 7). A heparina, entretanto, apresentou um alto efeito anticoagulante em todas as massas utilizadas para teste de PT (< 120 s) ($p < 0,001$) (tabela 7).

Tabela 07. Atividade anticoagulante pelo teste de PT e APTT das frações polissacarídicas da alga vermelha *A. multifida* e heparina.

		Massa (μg)				
		0	50	100	150	200
APTT	Heparina	28,2 \pm 0,3	> 240	> 240	> 240	> 240
	FT	28,2 \pm 0,3	51,1 \pm 1,7	50,5 \pm 4,1	48,3 \pm 1,3	> 240
	F1	28,2 \pm 0,3	60,1 \pm 1,8	45,2 \pm 0,8	47,9 \pm 7,2	48,1 \pm 4,3
	F2	28,2 \pm 0,3	53,5 \pm 1,1	53,3 \pm 0,4	42,9 \pm 0,1	27,2 \pm 0,9
	Heparina	6,2 \pm 0,2	>120	>120	>120	>120
PT	FT	6,2 \pm 0,2	nd	11,9 \pm 0,2	10,7 \pm 0,3	10,6 \pm 0,0
	F1	6,2 \pm 0,2	nd	12,2 \pm 0,3	10,9 \pm 1,1	13,9 \pm 1,0
	F2	6,2 \pm 0,2	nd	10,7 \pm 0,7	12,2 \pm 0,7	11,7 \pm 0,8
	Heparina	6,2 \pm 0,2	>120	>120	>120	>120

4.2.2. Atividade antioxidante das frações polissacarídicas da alga *A. multifida*.

4.2.2.1. Análise do poder redutor

As frações polissacarídicas testadas e κ -carragenana comercial (padrão) apresentaram poder redutor (figura 28). A κ -carragenana foi a que apresentou menor poder redutor (0,323) na maior concentração (8 mg/mL), atingindo um platô após 2 mg/mL. A fração que obteve melhor atividade foi a FT (0,533) com efeito dose-dependente, e a F1 com menor poder de redução (0,396), considerando a maior concentração (8 mg/mL) da fração utilizada. Já a fração F2 apresentou um pequeno efeito com 2 mg/mL (0,132), aumentando consideravelmente com 4 mg/ml (0,422), onde atingiu um platô (figura 27).

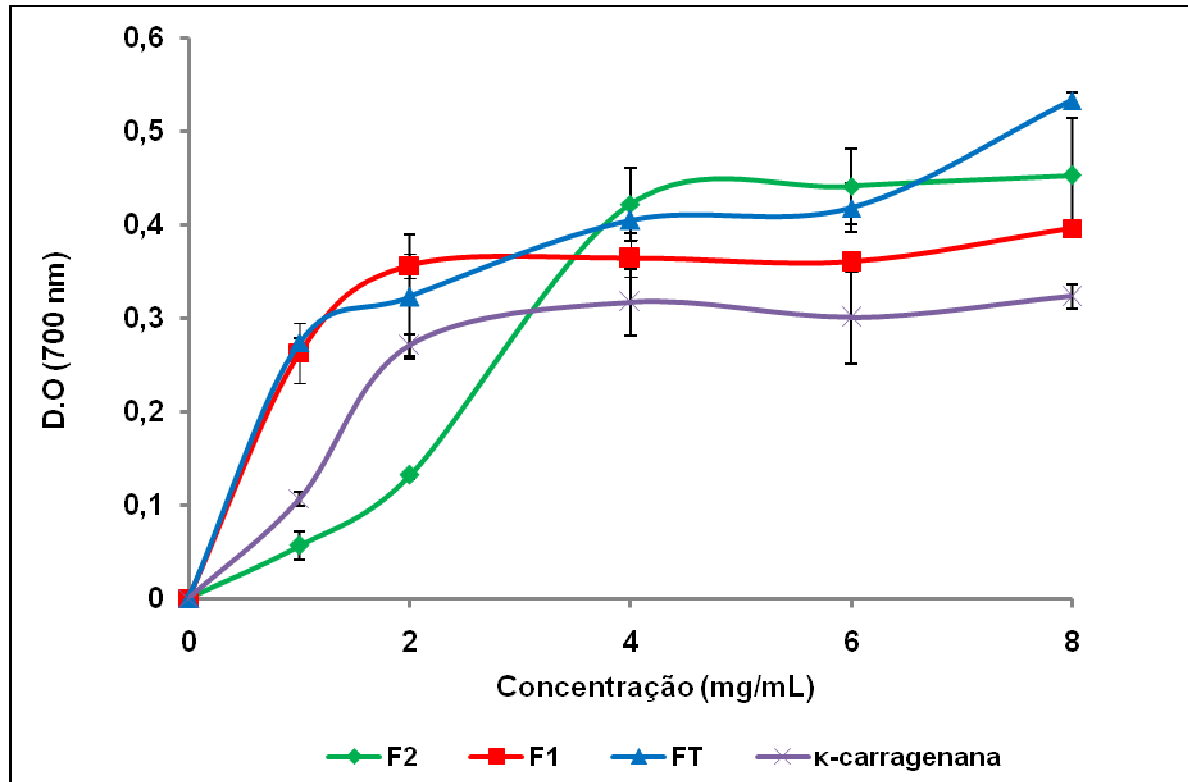


Figura 27. Perfil de poder redutor das frações polissacarídicas da alga *A. multifida* e de uma κ -carragenana comercial.

4.2.2.2. Capacidade Antioxidante Total

De uma forma geral, foi mensurada a capacidade antioxidante total das frações polissacarídicas e da κ -carragenana, expresso em equivalente de ácido ascórbico (Tabela 8). Observou-se que as frações apresentaram capacidade antioxidante total semelhante, sendo a FT mais ativa ($18,65 \pm 0,26$ mg/g). A fração F1 demonstrou menor capacidade antioxidante total ($15,01 \pm 0,48$ mg/g) e a fração F2 com atividade intermediária ($17,41 \pm 0,19$ mg/g) entre as duas outras frações. A κ -carragenana apresentou equivalente de ácido ascórbico de $19,18 \pm 0,20$ mg/g, sendo maior que as frações de *A. multifida*.

Tabela 8. Capacidade antioxidante total das frações polissacarídicas da alga *A. multifida*, e de uma kappa carragenana comercial, *in vitro*. *Os valores foram expressos em miligrama de ácido ascórbico por grama de amostra

Frações	Equivalente de ácido ascórbico (mg /g)*
F1	15,01 ± 0,48
F2	17,41 ± 0,19
FT	18,65 ± 0,26
κ- carragenana	19,18 ± 0,20

4.2.2.3. Inibição do radical Superóxido

A figura 28 mostra o perfil de inibição do radical superóxido pelas três frações polissacarídicas e de uma κ-carragenana comercial. A partir dos dados obtidos podemos observar boa atividade de varredura do radical superóxido pelas amostras testadas, com todas as frações apresentando efeito dose-dependente. Levando em consideração maior concentração (8 mg/mL), a fração F2 apresentou maior atividade, atingindo inibição máxima de 63%, seguido da FT com 49% e F1 com menor efeito sobre os radicais superóxidos, com apenas 28%. A κ-carragenana atingiu um platô com 1 mg/mL até 6mg/mL, em torno de 37%, havendo um pequeno aumento para 41% de inibição do radical superóxido com 8 mg/mL.

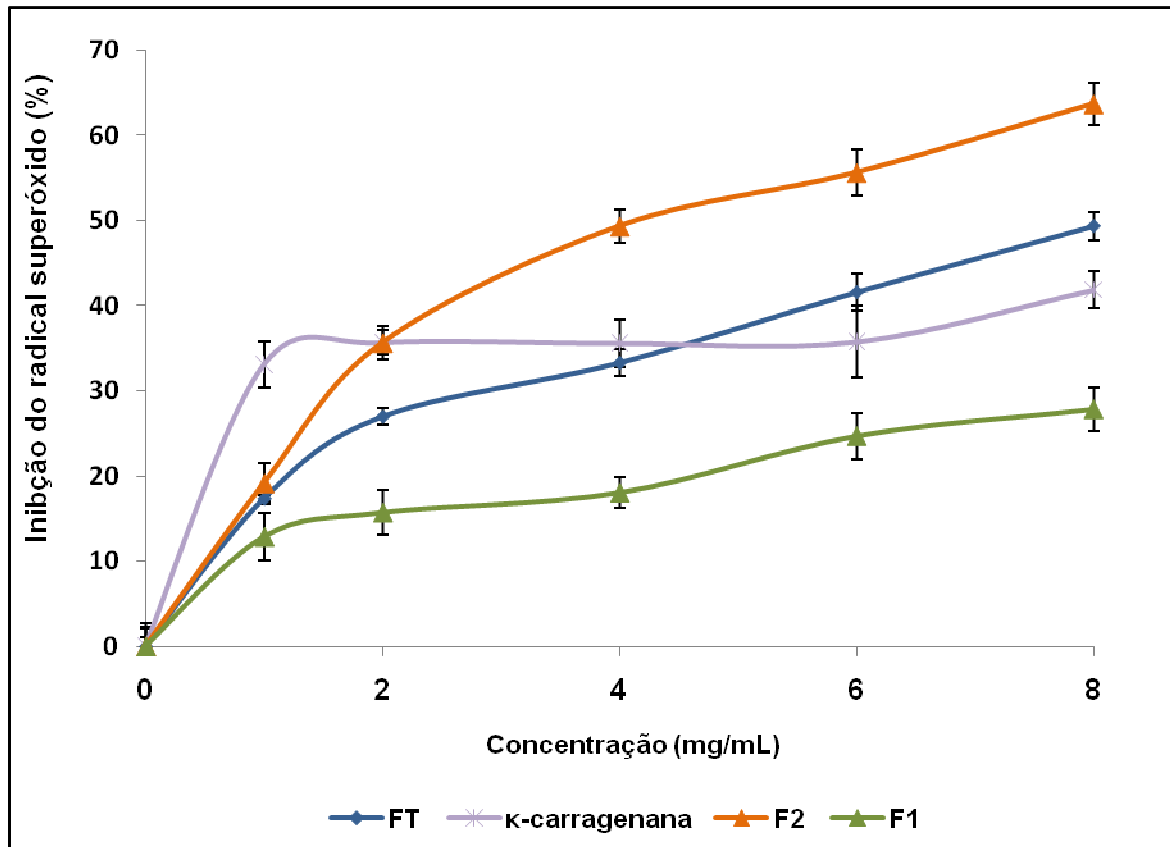


Figura 28. Perfil de atividade antioxidante frações polissacarídicas da alga *A. multifida*, e de uma *kappa* carragenana comercial, avaliado pela inibição do radical superóxido.

4.2.2.4. Inibição do radical hidroxila

A figura 29 mostra a inibição do radical hidroxila pelas frações polissacarídicas em estudo e a κ -carragenana. Pode-se observar um efeito de inibição desse radical pelas frações F1 e F2, onde a FT não apresentou atividade antioxidante nas concentrações testadas para esse ensaio. Dentre todas as frações, a F2 apresentou maior atividade, inibindo em torno de 19% dos radicais hidroxilas formados, com 8 mg/mL. Já a fração F1 atingiu 11% de inibição nessa mesma concentração. A κ -carragenana, para esse ensaio, se mostrou pró-oxidante, aumentando em torno de 14% a geração de radicais hidroxilas. O BHT, antioxidante sintético, atingiu o platô com apenas 2 mg/mL, promovendo 34% de inibição desses radicais em estudo.

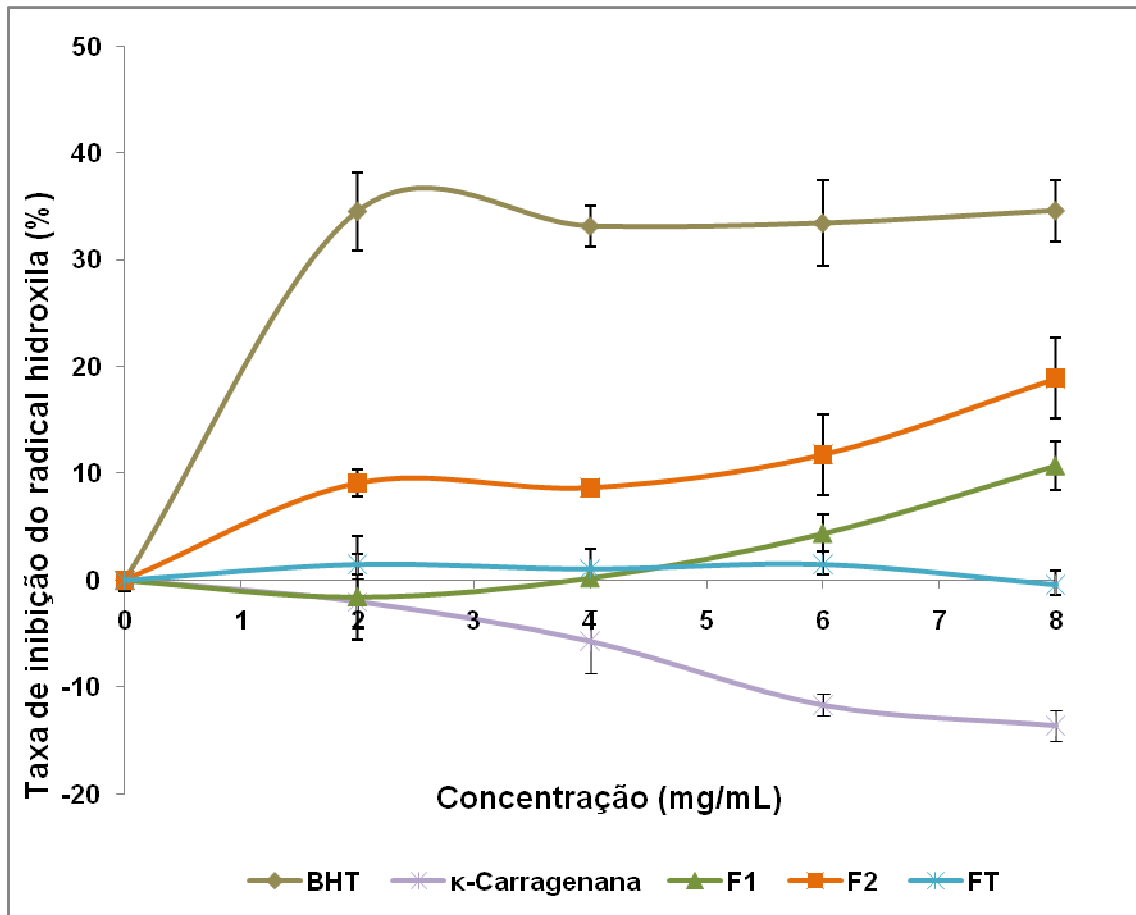


Figura 29. Perfil de atividade antioxidante frações polissacarídicas da alga *A. multifida*, de uma kappa carragenana comercial e BHT, avaliado pela inibição do radical hidroxila.

4.2.2.5. Quelação do íon ferro (Fe^{+2})

A figura 30 apresenta os perfis de quelação do íon ferro da fração em estudo, de uma kappa-carragenana comercial e BHT. A fração F1 apresentou efeito dose-dependente na quelação do ferro, promovendo 71% de atividade. A fração atingiu o platô com 6 mg/mL, apresentando atividade quelante de 84%. Já a fração FT e a kappa-carragenana não mostraram nenhum efeito quelante de ferro nas concentrações testadas. A atividade quelante para o BHT ficou em torno de 26% com 8 mg/mL.

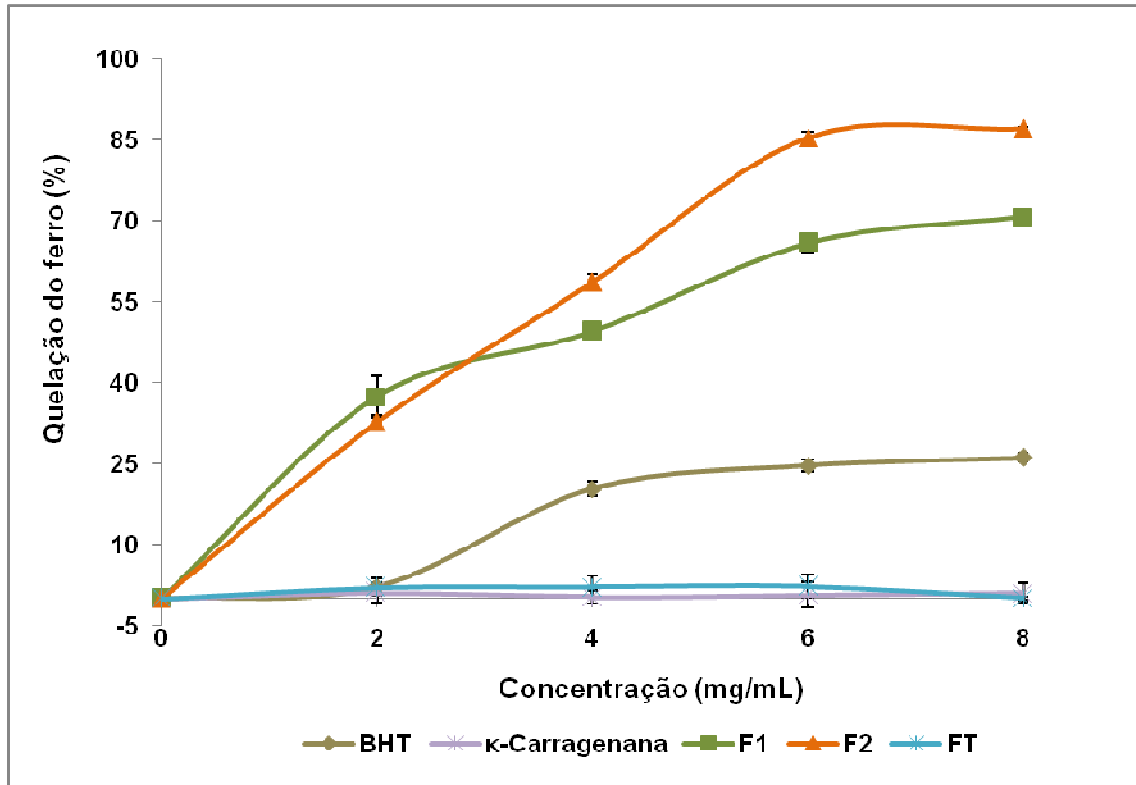


Figura 30. Perfil de quelação íon ferro (Fe^{+2}) pelas frações polissacarídicas da alga *A. multifida*, de uma *kappa* carragenana comercial e BHT.

4.2.2.6. Inibição da peroxidação lipídica

A figura 31 mostra o perfil de inibição da peroxidação lipídica das frações polissacarídicas, κ -carragenana comercial e o α -tocoferol. O α -tocoferol apresentou alta inibição da peroxidação, atingindo um platô após 2 mg/mL com atividade máxima de 80% de inibição já com 4 mg/mL. As frações polissacarídicas da alga *Amansia multifida* não obtiveram efeito inibidor da peroxidação lipídica nas concentrações testadas. Já a κ -carragenana apresentou uma discreta inibição (~17%) na maior concentração testada (8 mg/mL).

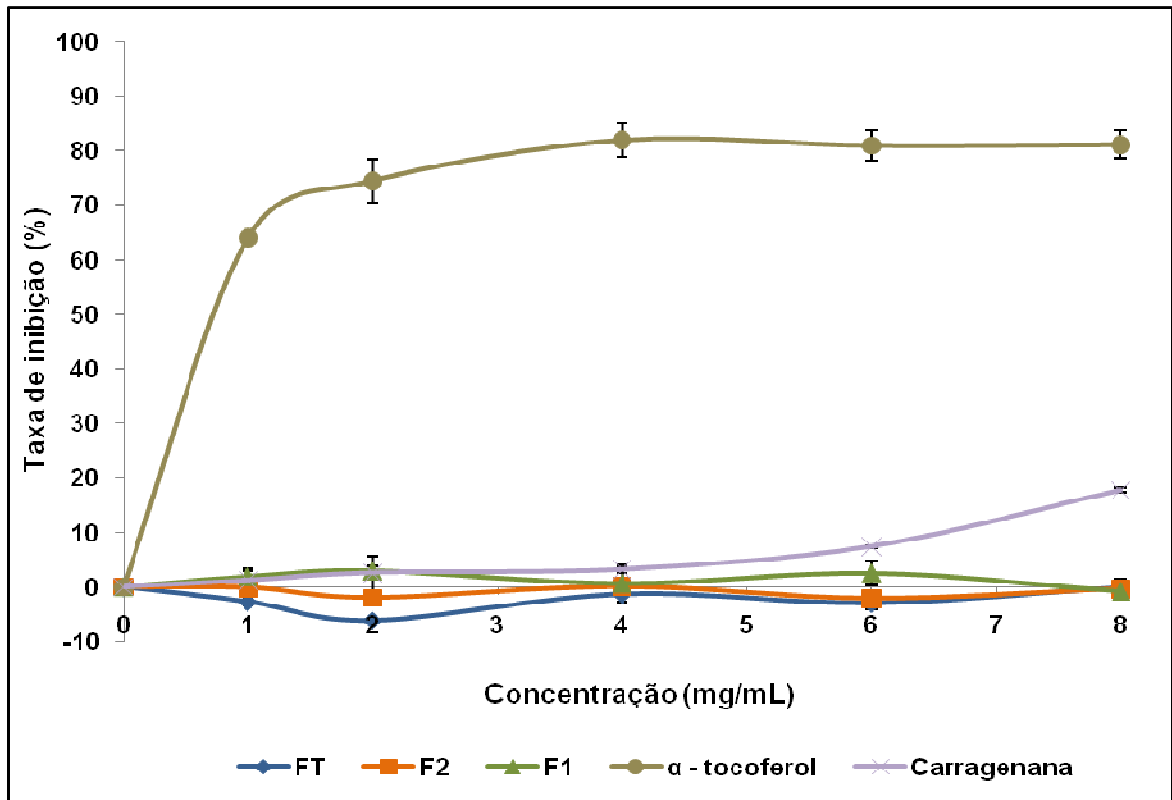


Figura 31. Perfil da peroxidação lipídica das frações polissacarídicas da alga *A. multifida*, κ-carragenana comercial e α-tocoferol.

4.2.3. Atividade inflamatória das frações polissacarídicas da alga *A. multifida*

4.2.3.1. Atividade hemolítica direta

A figura 32 mostra o perfil lise direta nas hemácias das três frações polissacarídicas em estudos, nas massas de 10, 25 e 50 µg. Como pode-se observar, nenhuma das frações estimulou a hemólise além do normal observado nas hemácias não tratadas.

4.2.3.2. Atividade hemolítica via sistema complemento

O poder pró-inflamatório das três frações polissacarídicas em estudo foi mensurado pelo ensaio que avalia sua ação pela via alternativa do sistema complemento, utilizando eritrócito de coelho, pelo método descrito anteriormente. O

teste foi realizado para todas as frações utilizando a massa de 10, 25 e 50 μg . O efeito das frações no sistema complemento é demonstrado na figura 32.

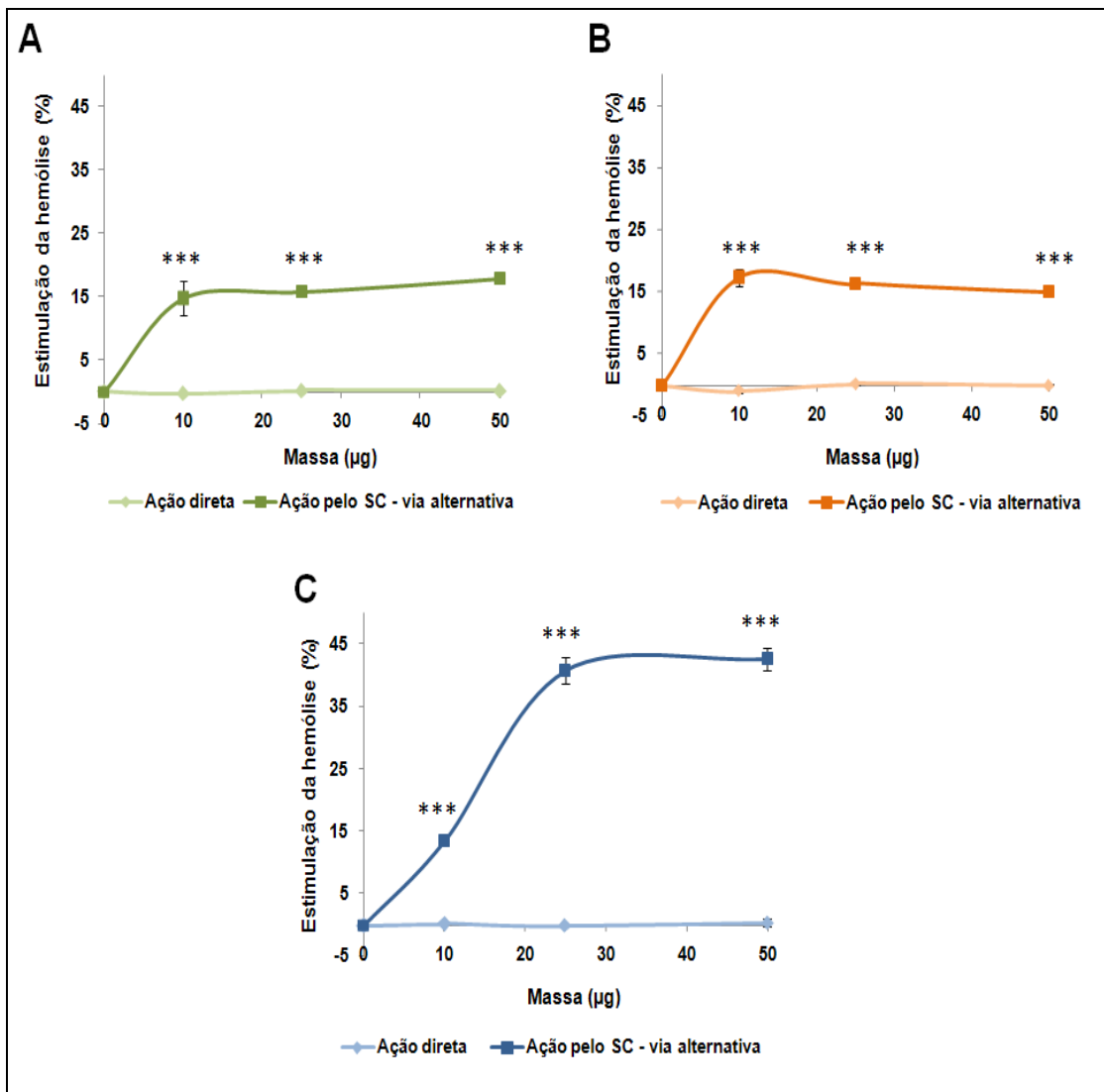


Figura 32. Perfil hemolítico das frações polissacarídicas F1 (A), F2 (B) e FT (C) de *A. multifida*. SC: sistema complemento. Os resultados foram expressos pelas médias e desvio-padrão. O teste ANOVA foi aplicado como método estatístico. *** $p < 0,001$.

Os resultados mostraram que todas as frações estimularam a lise das hemácias nas massas testadas ($p < 0,001$) (figura 32). A fração F1 apresentou efeito semelhante nas massas testadas, aumentando a hemólise em 17,4% ($p < 0,001$), onde o platô foi atingido com 10 μg . A fração F2 apresentou atividade hemolítica nas massas testadas, atingindo o platô com 10 μg , apresentando 15,5% de estimulação da lise de hemácias pela via alternativa do sistema complemento ($p < 0,001$). A fração FT mostrou maior efeito hemolítico pela via alternativa do sistema complemento, causando uma elevação de 40,7% (25 μg) e 42,6% (50 μg) ($p < 0,001$) (figura 32), Por

apresentar melhor atividades nesse ensaio e no de coagulação (aPTT), a fração FT foi selecionada para os testes subseqüentes de inflamação *in vivo*.

4.2.3.3. Peritonite aguda em camundongos da fração FT

4.2.3.3.1. Análise da contagem global de leucócito do lavado peritoneal.

A figura 33 mostra o perfil migratório de leucócitos para cavidade peritoneal após 3 h de indução com as frações polissacarídicas e uma κ -carragenana comercial.

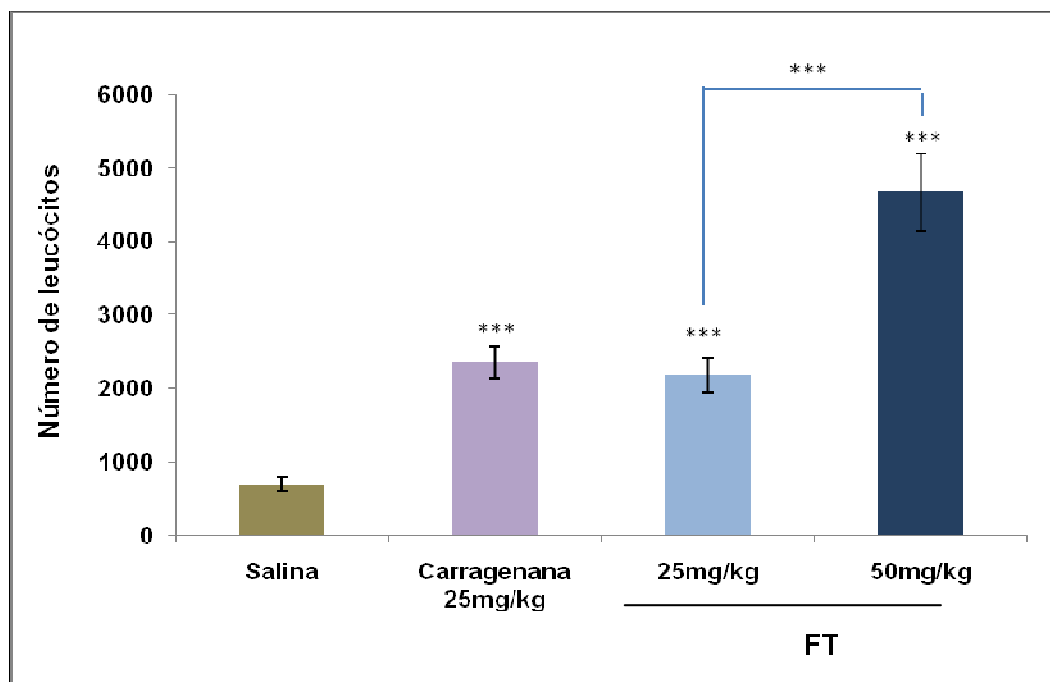


Figura 33. Perfil de migração leucocitária para o peritônio após 3 h de tratamento com salina (NaCl 0,9%), carragenana κ (25 mg/kg de PC) e Fração FT (25 e 50mg/kg de PC) da alga *Amansia multifida*. Os resultados foram expressos pelas médias e desvio-padrão. O teste ANOVA foi aplicado como método estatístico. ***P < 0,001 vs. Controle negativo (grupo não tratado).

Além da fração FT, utilizou-se uma κ -carragenana comercial como padrão. O grupo controle tratado com κ -carragenana (25 mg/kg de PC) promoveu aumento de 337.2% na migração de leucócitos, comparado ao grupo tratado apenas com salina ($p < 0,001$). A fração FT na mesma dose promoveu um aumento de 313.8% na migração celular, quando comparado ao grupo tratado apenas com salina ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística entre a κ -carragenana comercial e fração FT na mesma dose (25 mg/kg de PC). Ao dobrar a dose da fração FT (50 mg/kg de PC)

observa-se um aumento proporcional (670.1%) na migração de leucócitos ($p < 0,001$), mostrando o seu efeito dose-dependente, com diferença significativa entre as duas doses desta fração ($p < 0.001$) (figura 33).

4.2.3.3.2. Concentração de IL-6 do lavado peritoneal.

A figura 34 mostra os valores da dosagem de IL-6 no lavado peritoneal dos quatros grupos analisado, pelo método de Elisa sanduíche.

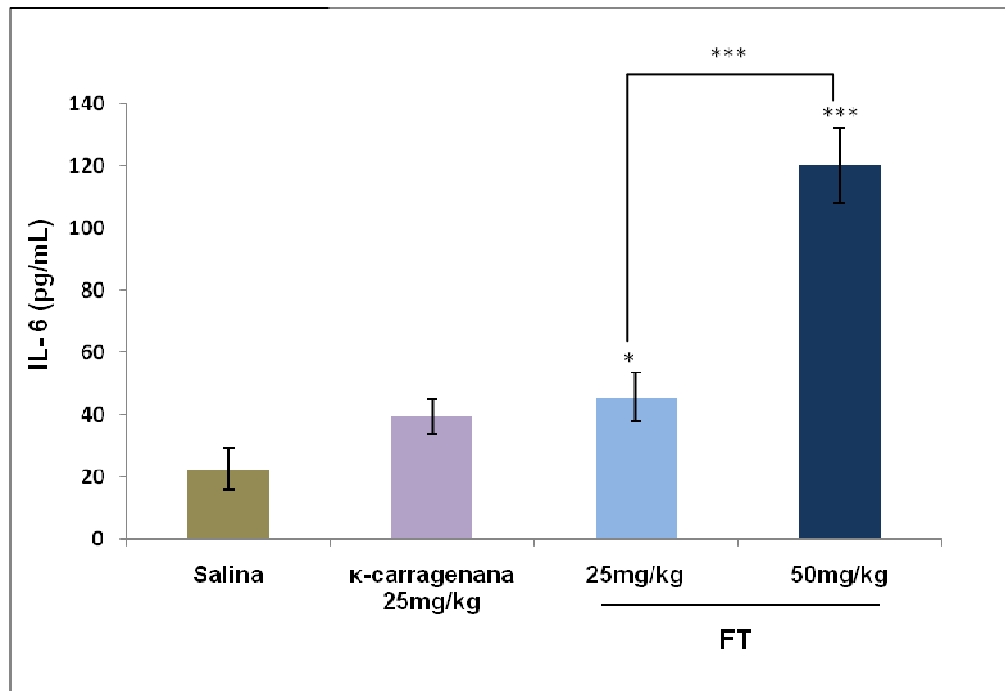


Figura 34. Concentração de IL-6 do lavado peritoneal após 3h de tratamento com salina (NaCl 0,9%), carragenana *kappa* (25 mg/kg de PC) e Fração FT (25 e 50mg/kg de PC) da alga *Amansia multifida*. * $p < 0,05$ *** $P < 0,001$ vs. Controle negativo.

Os resultados mostraram que no grupo tratado com κ-carragenana (25 mg/kg de PC), houve um aumento da produção de IL-6 (39 pg/mL) quando comparado ao grupo de animais não tratados (22.6 pg/mL), não sendo estatisticamente significativa. Em contraste, o grupo tratado com fração FT (25 mg/kg de PC), a concentração de IL-6 aumentou para 45.8 pg/mL ($p < 0.05$). Esse efeito foi aumentado quando se tratou os animais com o dobro da dose (50 mg/kg de PC), chegando a uma concentração de 120.2 pg/mL de IL-6 no lavado peritoneal ($p < 0.001$), quando comparado ao grupo tratado com solução salina (figura 35), sendo esse aumento na ordem de 531.8%. Comparando os dois grupos tratados com a fração FT (25 e 50

mg/kg de PC), observou-se um efeito dose-dependente e estatisticamente significantes ($p < 0.001$) (figura 34).

4.2.4. Efeito na viabilidade celular das frações polissacarídicas da alga *A. multifida*.

A figura 35 mostra o efeito das frações polissacarídicas da alga *A. multifida* na viabilidade dos fibroblastos 3T3, no período de 24 e 48h.

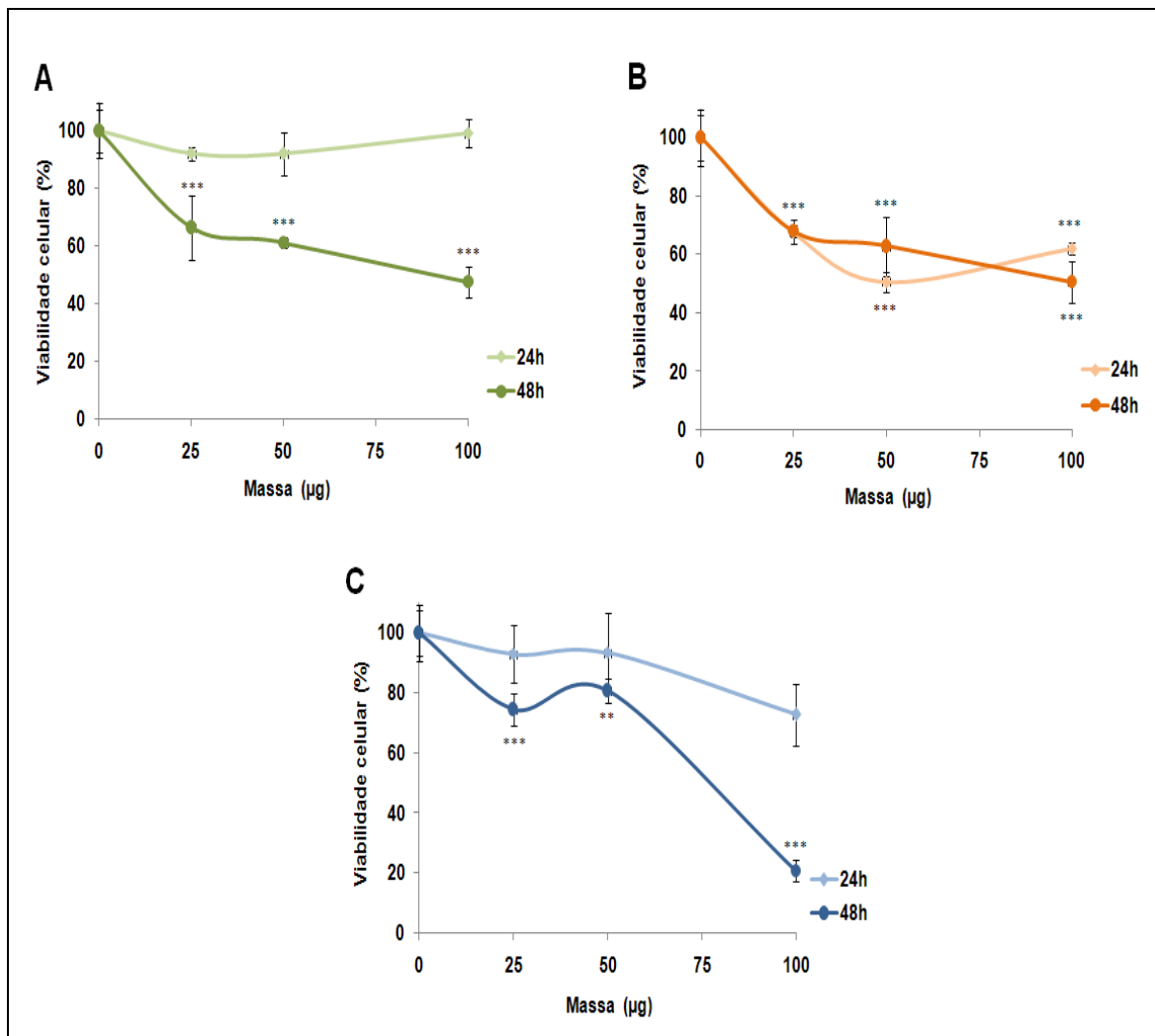


Figura 35. Efeito na viabilidade celular das frações polissacarídicas, F1 (A), F2 (B) e FT (C) da alga *A. multifida* no crescimento dos fibroblastos 3T3, no período de 24 e 48h, avaliado pelo método de MTT. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo método de ANOVA com $**p < 0,05$ e $***p < 0,001$.

Após 24 h de incubação com as frações polissacarídicas, a fração F2 apresentou efeito tóxico, diminuindo a viabilidade celular em todas as massas

testadas ($p < 0,001$), tendo maior efeito com 50 μg (49%) (figura 35B). As frações F1 e FT não apresentaram efeito tóxico significativo em 24 h (Figura 35A e C).

Os dados analisados após 48 h de incubação com as frações, revelaram que a fração F1 apresentou uma ação tóxica em todas as massas testadas, com efeito dose-dependente, promovendo 52,4% (100 μg) de inibição do crescimento celular ($p < 0,001$) (Figura 35A). A fração F2 apresentou um perfil semelhante ao encontrado durante 24 h, não havendo diferença estatística entre esses dois tempos para esta fração, mostrando não haver relação tóxica com o tempo de exposição das amostras, nas massas testadas (figura 35B). A fração FT se mostrou a mais tóxica de todas em 48 h, apresentando uma inibição do crescimento celular de até 79,1% (100 μg) (figura 35C).

O estudo realizado com as células tumorais (Figura 36) mostrou um perfil citotóxico diferente do observado nas células saudáveis. A morte das células tumorais induzida pelas frações polissacarídicas durante 24 h mostrou que a fração F1 apresentou efeito citotóxico apenas nas menores massas testadas, realizando maior inibição com 50 μg (40%) ($p < 0,001$), não sendo observado efeito tóxico com 100 μg . Perfil similar foi observado com 48 h de incubação, onde com 50 μg obteve-se 44% de inibição (figura 36A), não apresentando diferença estatística entre os efeitos entre 24 e 48 h. A fração F2 apresentou efeito tóxico no crescimento das células HeLa em, apresentando um perfil de inibição idêntico nos dois tempos nas massas testadas. Para essa fração o maior efeito foi observado com 100 μg (~43,5%) ($p < 0,001$), como mostrado no figura 36B. Já a fração FT, após 24 h, observamos efeito tóxico significativo apenas com 25 μg (29,5%) para 24h de incubação ($p < 0,001$), o qual foi perdido com o aumento da massa (50 e 100 μg). No entanto, com o aumento do tempo de incubação para 48h, notou-se um efeito tóxico a 50 μg (35%) ($p < 0,001$), permanecendo a massa de 100 μg sem efeito significativo (figura 36C).

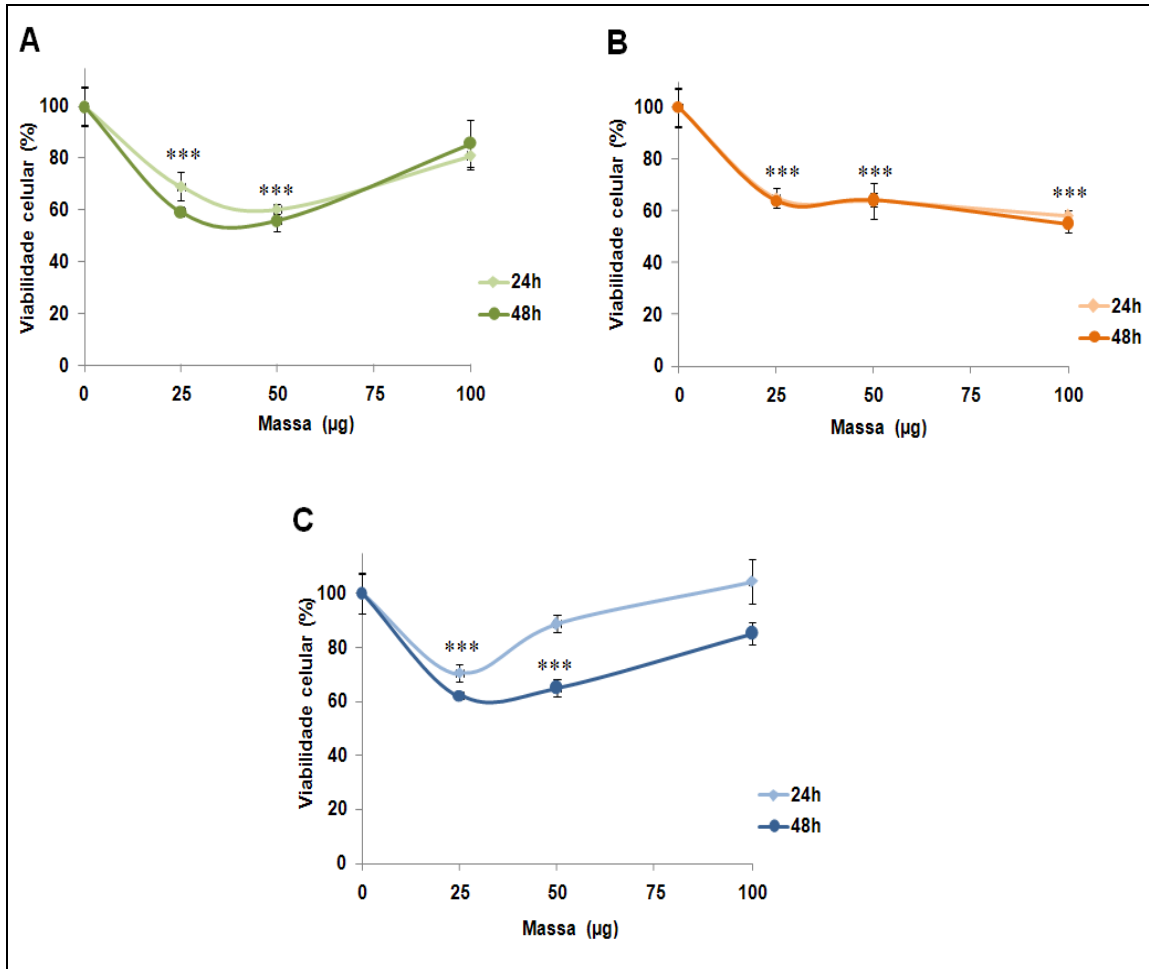


Figura 36. Efeito na viabilidade celular das frações polissacarídicas, F1 (A), F2 (B) e FT (C) da alga *A. multifida* no crescimento das células HeLa (câncer de colo uterino) no período de 24 e 48h, avaliado pelo método de MTT. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo método de ANOVA com $**p < 0,05$ e $***p < 0,001$.

5. Discussão

Em geral, é importante estudar a relação entre a estrutura química de polissacarídeos para estabelecer uma correlação com suas atividades biológicas. No entanto, polissacarídeos são geralmente polímeros complexos e compostos por vários monossacarídeos com diferentes ligações glicosídicas. Além disso, os polissacarídeos, muitas vezes, têm altos pesos moleculares e tendem a formar agregados em solução o que pode dificultar seu comportamento. Em consequência, para caracterizar as estruturas químicas e conformações das cadeias de polissacarídeos seria requerido diversos tipos de metodologias (YANG & ZHANG, 2009).

A atividade de polissacarídeos estruturais de algas depende de vários parâmetros, tais como, grau de sulfatação, peso molecular, conteúdo de proteínas, tipo de açúcar e ramificações glicosídicas (ALBAN, SCHAUERTE, & FRANZ, 2002).

Estudos realizados com kappa, iota e lambda carragenanas (SILVA, et al., 2005) e galactana, da alga *G. grinalis* (PEREIRA et al., 2005) apresentaram polidispersão na migração eletroforética em gel de agarose, indicando várias populações de polissacarídeos, comuns em carboidratos complexos.

Na literatura é escasso o estudo de análise térmica de polissacarídeos de algas vermelhas utilizando-se o oxigênio como atmosfera em vez de nitrogênio e outros gases. Neste trabalho, foram realizadas análises térmicas de uma kappa-carragenana comercial (padrão) e observou-se que as frações polissacarídicas de *A. multifida* apresentaram perfis próximos indicando similaridade com os compostos extraídos dessa alga. Além disso, pode-se verificar a presença dos carbonatos, comuns na parede celular das algas vermelhas (PERCIVAL & MCDOWELL, 1967).

Estudos realizados com uma kappa carragenana (RAMAVATAR MEENA et al., 2009) e uma galactana sulfatada da alga vermelha *Gracilaria cornea* (MELO et al., 2002), mostraram valores de umidade próximos aos encontrados nas frações em estudo, com 13,6% para a kappa carragenana e em torno de 11% nas três frações obtidas a partir da *G. cornea*. O estudo com esta kappa carragenana demonstrou também, valor de cinzas (18,9%) próximo ao obtido na fração F1 (21,7%). Nesse mesmo estudo, com kappa carragenana

o teor de sulfato (17,2%) encontrado foram próximos aos dados obtidos com a FT (19,6%) e F2 (18%).

Zhang e colaboradores (2003) ao extraírem polissacarídeos da alga vermelha *Porphyra haitanesis*, obtiveram valores de sulfato da ordem de 17,4%, similares com os dados obtidos neste estudo. A extração a partir da alga marinha *A. multifida*, resultou em um composto com teores de carboidratos similares a outros encontrados na literatura, como nas frações das rodofíceas *Gymnogongrus griffithsiae* (TALARICO, 2004), *P. haitanensis* (ZHANG et al., 2003) e κ-carragenana comercial (SILVA et al., 2010). A baixa contaminação protéica observada nas frações coincide com os valores apresentados para carragenanas do tipo iota, kappa e lambda (SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2005). A dosagem de açúcares totais (TC%) confirma as proporções apresentadas nas análises térmicas por termogravimetria, onde $TC\%F1 > TC\%FT > TC\%F2$.

Segundo Percival & McDowell (1967) e Van de Valde (2004), galactanas de algas vermelhas podem apresentar os açúcares: galactose, glicose, manose, xilose como predominantes, podendo conter ainda, ácido glicurônico (em menor quantidade). Resultados obtidos neste trabalho, demonstraram que as frações polissacarídicas de *A. multifida* contem estes monossacarídeos. Além disso, esses autores destacaram que somente as algas marrons possuem fucose em seus polissacarídeos.

Estudo realizados com galactanas sulfatadas das algas, *Bostrychia montagnei* (DUARTE et al., 2001), *Georgiella confluens* (KOLENDER et al., 2002) *Gracilaria corticata* (MAZUMDER et al., 2002) e *Cryptonemia seminervis* (ZIBETTI et al., 2009) também apresentaram frações que continham proporções consideráveis de glicose e xilose.

A espectroscopia de infravermelho demonstrou que as frações de *A. multifida* apresentaram pico a 867 cm^{-1} , o qual está relacionado a C–O–SO₄ em C₆ da galactose, e intimamente relacionado às carragenanas do tipo Lambda (λ) e Nu (ν), onde o grupo S=O também estaria presente (PEREIRA, 2006). Além disso, o teor de sulfato nas frações estudadas mostrou correlação positiva com esse pico. A fração F1, menos sulfatada, praticamente não apresentou banda quando comparada com as demais frações com

considerável sulfatação. A presença de ácido glicurônico foi confirmada com as vibrações em $1630\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, corroborando com a sua presença na CDP.

O interesse em se empregar antioxidantes de fontes naturais com o objetivo de aumentar a vida útil dos alimentos é consideravelmente reforçado pela preferência dos consumidores por ingredientes naturais e preocupações sobre os efeitos tóxicos dos antioxidantes sintéticos (SCHWARZ et al., 2001; TANG et al., 2001; DE LEONARDIS & MACCIOLA, 2003; FARAG et al., 2003). As algas marinhas vêm sendo consideradas como uma fonte rica em antioxidantes (NAGAI e YUKIMOTO, 2003). Estudos nos mostraram que ambos, BHA e BHT, poderiam ser tóxicos, com custos mais elevados de fabricação e menor eficiência do que antioxidantes naturais, tais como tocoferóis.

A consciência crescente por parte de consumidores na segurança de aditivo alimentar criou a necessidade de definir uma alternativa natural, e, fontes mais seguras de alimentos antioxidantes (WANASUNDARA & SHAHIDI, 1998).

Todas as frações de *A. multifida*, mostraram poderes de redução de uma molécula oxidada. Observou-se uma correlação positiva com o teor de sulfato encontrado em cada fração polissacarídica, sugerindo uma relação entre o teor de sulfato e atividade antioxidante dessas moléculas. Yuan e colaboradores (2005) realizaram um estudo com oligossacarídeos de kappa carragenana verificando que sua atividade antioxidante aumentava proporcionalmente com o teor de sulfato da amostra. Um ano depois, Yuan e colaboradores (2006) afirmaram que a atividade antioxidante poderia estar relacionada com a variação da capacidade de doação de seu átomo de hidrogênio. Concluíram que o grupo sulfato das carragenanas, substituído na galactose, poderia ativar o átomo de hidrogênio do carbono anomérico. A mesma relação de conteúdo de sulfato e atividade antioxidante foi observado em polissacarídeos sulfatados de *Porphyra haitanesis* (ZHANG et al., 2003) e *Bryopsis plumosa* (SONG, ZHANG & ZHANG, 2010). Na varredura do radical superóxido, pode-se verificar que as frações que apresentam maiores teores de sulfato, foram as que tiveram maior capacidade de inibição desse radical. Os dados das frações corroboram com os dados encontrados por Souza e

colaboradores (2007), ao verificarem que uma iota carragenana comercial apresentou 62% de inibição do radical superóxido.

Na varredura do radical hidroxila verificou-se uma pequena atividade das frações, inclusive com o BHT (antioxidante sintético). O estudo realizado por Heo e colaboradores (2005) mostrou que o BHT e extratos enzimáticos das algas *Ecklonia cava*, *Ishige okamurae*, *Sargassum fullvelum* e *Scytosipon lomentaria*, também apresentaram baixa atividade antioxidante sobre os radicais hidroxilas, pelo mesmo método usado neste estudo. Efeito semelhante foi observado para fração FT e kappa carragenana, comprovado por Costa e colaboradores (2009), onde os polissacarídeos das algas *D. cervicornis*, *D. delicatula*, *S. filipendula*, *S. schroederi*, *C. cupressoides* e *C. isthmocladum* também não apresentaram esta atividade.

Souza e colaboradores (2007) ao avaliarem a ação antioxidante de frações polissacarídicas da alga marrom *P. gymnospora* verificaram que as frações analisadas apresentavam ação antioxidante em diversos sistemas *in vitro*, exceto na varredura do radical hidroxila, onde se mostrou pró-oxidante. Alguns trabalhos constataram que a atividade de varredura sobre os radicais hidroxila, é atribuível a inibição da geração destes radicais por quelação de íons como Fe^{2+} e Cu^{+2} , tornando-os inativos na reação de Fenton (SMITH et al., 1992; SHON et al., 2003). Os dados sugerem que a atividade varredura do radical hidroxila das frações estaria relacionada com sua capacidade quelante do ferro.

A fração FT e kappa carragenana não atuaram na inibição do radical hidroxila bem como não apresentaram efeito quelante de ferro. Estudos realizados por Yuan e colaboradores (2006), mostraram que as κ -carragenanas altamente acetiladas e pouco acetiladas não mostraram atividade quelante do ferro.

Nas frações, objeto desse estudo, não observamos atividades de inibição da peroxidação lipídica. Dados semelhantes foram verificados com galactanas sulfatadas da alga *Porphyra haitanensis* (ZHANG et al., 2004) onde as mesmas não promoveram alteração significativa na produção de MDA. Além disso, segundo Marzocoo e colaboradores (2004) as carragenanas quando injetadas em ratos, causavam aumento na produção de MDA, sendo este o indicador da peroxidação lipídica.

Produtos com diferentes pesos moleculares apresentaram atividades antioxidantes variadas (SONG, ZHANG & ZHANG, 2010). Zhao e colaboradores (2006) investigaram que no ensaio antioxidante, produtos de baixo peso molecular são mais eficazes do que outros de alto peso molecular. Estes resultados indicaram que a população de menor peso molecular da fração F1 foi a responsável pelo desempenho de sua atividade antioxidante, uma vez que também apresentou baixo teor de sulfato.

Souza e colaboradores (2008) realizaram um estudo onde foram quantificados os teores de α -tocoferol, β - caroteno, α - caroteno e retinol em dezenas de algas marinhas in natura, dentre elas a alga vermelha *Amansia multifida*, que apresentou esses quatro compostos em sua composição natural. Estes podem atuar, também, como compostos antioxidantes nesses seres marinhos. No entanto, o processo de extração e fracionamento tem como uma de suas características a retirada desses componentes da amostra. Além disso, quantidades insignificantes de compostos fenólicos foram observadas nas frações polissacarídicas, sugerindo que os polissacarídeos detêm a atividade antioxidante.

O uso de compostos anticoagulantes é muito comum na clínica médica. Anticoagulantes como heparina são bastante empregados, embora apresentem efeitos colaterais como trombocitopenias e hemorragias. Por outro lado, por ser de origem animal (FABRIS et al., 2000) podem conter contaminantes altamente deletérios, como príons (ROCHA, et al., 2004). Isto justifica a busca por novas drogas que não apresentem estes prejuízos para a saúde do paciente.

As frações alga *A. multififa* apresentaram ação anticoagulante atuando na via intrínseca da coagulação sanguínea. Estudos realizados por Silva e colaboradores (2010) com carragenanas comerciais, revelaram que as do tipo kappa e iota apresentaram apenas efeito anticoagulante pelo teste de APTT. A iota carragenana deteve maior atividade (> 240s) que a kappa (134s) a 100 μ g. Nesse mesmo estudo, a iota carragenana apresentou um perfil semelhante ao observado na fração FT (150 e 200 μ g) de *A. multifida*, com 60 μ g apresentou apenas 87,9 s com 100 μ g o tempo de APTT foi superior a 240 s. Além disso, estes autores afirmam que a ação das carragenanas pode estar relacionada com a potencialização da antitrombina. Costa e colaboradores (2009)

verificaram que polissacarídeos das algas *D. cervicornis*, *D. delicatula*, *D. mertensis*, *S. filipendula*, *G. caudata*, *C. cupresoides*, *C. prolifera*, *C. sertularioides* e *C. isthmocladum* não apresentaram atividade anticoagulante pelo teste de PT.

A atividade desses polissacarídeos deve-se provavelmente ao conteúdo de sulfato no composto (SHANMUGAN & MODY, 2000). No entanto, algumas vezes aquele eventualmente pode não estar diretamente relacionado com a atividade anticoagulante (ANDERSON & DUNCAN, 1965). Outros fatores devem ser levados em consideração, como tamanho do polímero e a presença de uma região pentassacarídica altamente aniônica como ocorre na heparina (LEVI, 2004).

A inflamação e coagulação possuem grande importância no estudo de doenças vasculares. As evidências de ligação entre esses dois sistemas são cada vez maiores, considerando que não apenas a inflamação dispara a coagulação, mais o inverso também é observado. Como exemplo dessa íntima relação, podemos destacar a ativação da coagulação e deposição de fibrina como uma consequência da inflamação. Este mecanismo é bem conhecido e pode ser visto como uma parte essencial da defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos e células estranhas. Em um esforço para conter o invasor e limitar a resposta imune a uma área restrita (LEVI et al., 2004; LEVI, 2004). Levando em consideração esses eventos, as frações polissacarídicas apresentaram efeitos peculiares, pois atuaram como anticoagulante e inflamatório. O fato é que a ação anticoagulante desse composto não está relacionada a seu poder inflamatório e sim a sua estrutura química, como descrito anteriormente.

Desde a publicação feita pelo Winter (1967), o modelo de inflamação experimental induzida pela injeção intraplantar (i.pl) de carragenana, em ratos, teve e continua tendo papel vital na avaliação do efeito antiinflamatório de novas drogas ou de recursos fisioterapêuticos.

O estudo do efeito inflamatório das frações polissacarídicas inicia-se com a observação de seu efeito hemolítico, tanto diretamente sobre as hemácias quanto pela via alternativa do complemento. As frações não atuaram diretamente sobre as hemácias provocando sua lise celular.

A fração FT foi a que apresentou maior atividade no ensaio de hemólise. Em 1954, Pillemer demonstrou que o complemento podia ser ativado por outros agentes, além do complexo antígeno- anticorpo (PILLEMER, 1954), pela evidência de que a incubação de soro não imune com polissacarídeos, como o zymosan, poderia levar ao consumo do complemento, por um caminho chamado de via alternativa.

O processo inflamatório foi estudado em um modelo de peritonite em ratos da linhagem Swiss. Comparado com a κ -carragenana padrão, a fração FT, na mesma dose, apresentou efeito similar na migração de células leucocitárias, mostrando sua potente ação na indução da migração celular. O estudo realizado por Silva e colaboradores (2010), avaliou também o feito inflamatório desses compostos, pelo ensaio de pleurisia em ratos. Nesse estudo a contagem de leucócitos do fluído pleural mostrou que os três tipos de carragenanas induziram a migração de leucócitos.

Outro método utilizado para avaliar o papel desses polissacarídeos na inflamação foi a dosagem da concentração de IL-6 no lavado peritoneal. Segundo Ferreira e colaboradores (1993) a dor inflamatória induzida pela carragenana, inicia-se indiretamente com a bradicinina ou diretamente o TNF, que estimulam a liberação de IL-6. A produção aumentada de IL-6 está envolvida na patogênese de diversas doenças inflamatórias, podendo causar leucocitose, trombocitose, etc. (NISHIMOTO E KISHMOTO, 2004). Assim, sua indução pode levar a um aumento da resposta inflamatória no sítio de injúria, aumentando o recrutamento do número de leucócitos. Neste estudo, as dosagens de IL-6 mostraram um perfil de indução que corrobora com o encontrado na migração de leucócitos. A IL-6 é freqüentemente utilizada como um marcador para a ativação sistêmica das citocinas pró-inflamatórias (BARTON, 1997). O estudo realizado por Frode, Souza e Calixto (2002) verificou que a inflamação induzida por carragenana na cavidade pleural reduz significativamente o infiltrado de células quando administrado um anticorpo anti-IL-6. Isto demonstra que esta citocina tem um papel fundamental na inflamação induzida por esses polissacarídeos.

As frações polissacarídicas provocaram a diminuição da viabilidade das células saudáveis e tumorais. Supostamente seu efeito apoptótico nas células saudáveis estaria relacionado ao processo inflamatório o qual ela

estimula. Efeitos gastrointestinais de carragenana em animais foram relatados, particularmente de cólon ou ulceração cecal com algumas formas de carragenanas em cobaias de suínos (ABRAHAM et al., 1974), coelhos (Watt & Marcus, 1973) e macacos (BENITZ, GOLDBERG, COULSTON, 1973). Recentemente, Tobacman e colaboradores (2008) demonstraram que a exposição de células do epitélio intestinal de humanos as carragenanas ingeridas resultaram na elevação da morte, reduzindo a proliferação e parada do ciclo celular, quando comparado às células do controle não exposto (BHATTACHARYYA, BORTHAKUR, DUDEJA, & TOBACMAN, 2008). De acordo com estes dados, o uso extensivo de carragenanas como aditivos alimentares deve ser reconsiderado. Ao mesmo tempo, a segurança das carragenanas para uso em alimentos foi confirmada na 57ª reunião do JECFA - Alimentos comum e Organização da agricultura das Nações Unidas / Comitê Pericial da Organização Mundial da Saúde em Aditivos Alimentares (JECFA, 2001). De acordo com o JECFA, apenas carragenanas degradadas foram associados efeitos adversos e não devem ser utilizadas como aditivos alimentares. No entanto, numa perspectiva mais ampla, é verdade que a exposição à carragenana não degradado é inevitavelmente acompanhada por uma exposição a carragena degradadas. Seis anos depois, o JECFA reavaliou a sua posição e declarou que o uso de carragenanas na fórmula infantil como não recomendada, e sugerindo novos estudos sobre o consumo destes polissacarídeos na dieta (JECFA, 2007).

Ao mesmo tempo em que as frações polissacarídicas de *A. multifida* provocam diminuição da viabilidade celular em células normais, o mesmo foi evidenciado com células tumorais. Em especial, a fração FT com 100 µg (massa na qual obteve-se maior efeito citotóxico nas células saudáveis) não houve nenhum efeito na morte das células tumorais. Isso denota um efeito maléfico dessa fração. Zhou e colaboradores (2004) Investigaram o efeito da carragenina em células tumorais S180 e H22 *in vitro* e descobriu que λ - Carragenanas não poderiam provocar morte em células tumorais diretamente. As atividades antitumorais de carragenana não seriam devido à sua ação citotóxica e sim devido à imunomodulação (ISHIZAKA et al. 1980).

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, R.; FABIAN, R.J.; GOLDBERG, L.; COULSTON, F. Role of lysosomes in carrageenan-induced cecal ulceration. **Gastroenterology**; v.67, p.1169-81, 1974

ADACHI, Y. et al. Change of biological activities of (1→3)-β-D-glucan from *Grifola frondosa* upon molecular weight reduction by heat treatment. **Chem. Pharm. Bull.** v. 38, p. 477-481, 1990.

ADELSBERG, B. A conceptual view of the complement system. **Pediatric Annals**, v.16, p.477-82, 1987.

AL MEHDI, A.B., DODIA, C., JAIN, M.K., FISHER, A. B. A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. **Biophys. Biochim. Acta**, v.1166, p.56-62, 1993.

ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; & FRANZ, G., Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrate Polymers**, v.47, p.267–276, 2002.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S.. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

ANDERSON, W. & DUNCAN, J. G. C. The anticoagulant activity of carrageenan. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.17, p. 647-654, 1965.

BARTON, B. E. IL-6: Insights into novel biological activities. **Clin Immunol Immunopathol.**, v.85, p.16–20, 1997.

BELOKONEVA, O. S.; VILLEGAS, E.; CORZO, G.; DAI, L.; NAKAJIMA, T., The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine- sphingomyelin ratio in lipid bilayers. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1617, p.22–30, 2003.

BEMILLER, J. N.. Polysaccharides: Occurrence, significance, and properties. In B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, & J. Thiem (Eds.), **Glycoscience: Chemistry and chemical biology**. 2008, p. 1413–1435. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

BENITZ K. F, GOLDBERG L, COULSTON, F. Intestinal effects of carrageenans in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Food Cosmet Toxicol.**, v.11, p.565-75. 1973.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nut*, v.47, p.233-261, 1996.

BHATTACHARYYA, S., BORTHAKUR, A., DUDEJA, P. K., & TOBACMAN, J. K. Carrageenan induces cell cycle arrest in human intestinal epithelial cells in vitro. **Journal of Nutrition**, v.138, p.469–475, 2008.

BISACCHI, G. S. Anticoagulants, antithrombotics, and hemostatics. In D. J. Abraham (Ed.), **Burger's medicinal chemistry and drug discovery, cardiovascular agents and endocrines**. John Wiley & Sons Inc, 2003. Vol. 3, p. 283–338.

BLAISDELL, F. W. Heparin – Controversies and misconceptions. **Cardiovascular Surgery**, v.4, p.691–700, 1996.

BROWN, E.J. Adhesive interaction in the immune system. **Cell Biology**, v. 7, p.289-295, 1997.

BUBB, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, 19A(1), p.1–19, 2003.

CACERES, P. J.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; MATSUHIRO, B., & ZUNIGA, E. A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, v.53, p.81–86, 2000

CAMPO, V. L; KAWANO, D. F.; SILVA, J. R. D. B., CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis– A review. **Carbohydrate Polymers**, V.77, p.167–180, 2009.

CANOTILHO, J.; SOUSA, A. T. B.; PINTO, J. A. M. C. Análise térmica: interesse em tecnologia farmacêutica. Revisão do conjunto. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. XLII, n. 4, p. 5-12, 1992.

CARLUCCI, M. J.; SCOLARO, L. A.; & DAMONTE, E. B. Inhibitory action of natural carrageenans on herpes simplex virus infection of mouse astrocytes. **Chemotherapy (Basel)**, v.45, p.429–436, 1999.

CARDIOVASCULARWEB. Coagulação sanguínea. Disponível em <www.cardiovascularweb.com>, acessado em 01 de agosto de 2010.

COLMAN RW; CLOWES AW; GEORGE JN; HIRSH J & MARDER VJ. Overview of hemostasis. In: COLMAN RW; HIRSH J; MARDER VJ; CLOWES AW & GEORGE JN, eds. **Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice**, 4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 3-16, 2001.

CHAHADE, W. H. A reação inflamatória autoimune e possibilidades de seu controle (Parte 1). **Temas de Reumatologia Clínica**, v.10, n.2, jun/2009.

CHANDLER, S.F.; DODDS, J.H., The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. **Plant Cell Reports**, v.34, p.105–110. 1993.

CHUNG, S. K.; OSAWA, T.; & KAWAKISHI, S.). Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.118–123, 1997.

CLOROFILA. **Wikipédia, a enciclopédia livre**. Disponível em, <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Clorofila>> acessado em 26 de julho de 2010.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med**; v.111, p.918-31, 1989.

COMPLEMENT PATHWAY. **Wikipédia**, disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Complement_pathway.png> acessado em 26 de dezembro de 2009

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2009.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M. E FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.649-660, 2009.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; GILARD, E.; HAKE, P.; SALZMAN, A. L.; SZABÒ, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. **Free Rad. Biol. Medicine**. v. 24, p.450-459, 1998.

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

DE LEONARDIS, A., MACCIOLA, V., Effectiveness of caffeic acid as an antioxidant for cod liver oil. **International Journal of Food Science and Technology** v.38, p.475–480. 2003.

DECKER, E. A., & WELCH, B.. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.674–677, 1990.

DICKENS, B.; FLYNN, J.H. **Polymer Characterization**, ACS, New York, p. 209–232, 1983.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. **J Chromatogr.** v. 130, p. 299-304, 1977.

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

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, Baltimore, v.43, n.2, p.460-472, 1983.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.**, v.82, p.47—95, 2002.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A. AND DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v.8, p. 53–58, 2001.

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

DUTRA, R. C.; TAVARES, C. Z.; FERRAZ S. O.; SOUSA, O. V.; PIMENTA, D. S. Investigaç o das atividades analg sica e antiinfl amat ria do extrato metan lico dos rizomas de *Echinodorus grandifl orus*. **Brazilian Journal of pharmacognosy.** v.16(4), p.469-474, 2006.

ESMON, C.T. The impact of the inflammatory response on coagulation. **Thromb. Res.**, v.114, p.321–327, 2004.

FABRIS, F; LUZZATTO, G; STEFANI, P.M.; GIROLAMI, B.; CELLA, G.; GIROLAMI, A. Heparin-induced thrombocytopenia. **Haematologica**, v.85, p.72-81, 2000.

FARAG, R.S.; EL-BAROTY, G.S.; BASUNY, A.M. The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, p.81–87, 2003.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; & MOURAO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans: Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.29299–29307, 2000.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.**, v.110(3), p.1227- 1231,1993.

FISCHER AB. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. **Proceedings of a Brook Lodge Symposium**, Augusta, Apr. v.27-29, p.99-104, 1987.

FRANK, M. M. Complement in the pathophysiology of human disease. **N Eng J Med**, v.316, p.1525-1550, 1987.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, **34**: 229-237, jul./dez. 2001.

FRODE, T. S., SOUZA, G. E. P., CALIXTO, J. B.. The effects of IL-6 and IL -10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, V. 17, n. 3, p. 149–156, 2002.

GADJEVA, M.; THIEL, S.; JENSENJUS, J. C. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. **Curr Opin Immunol**, v.13, p.74-78,2000

GAILANI, D.; BROZE JR, G.J., Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. **Science**, v.253, p.909– 912, 1991.

GONZALEZ, M. E.; ALARCON, B.; & CARRASCO, L. Polysaccharides as antiviral agents: Antiviral activity of carrageenan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, p.1388–1393, 1987.

GÖTZE, O. The alternative pathway of activation *In*: Rother K, Till GO ed. **The complement system**. 1^a ed. Berlin, Springer-Verlag, 1988, p.154-67.

GREINACHER, A., & WARKENTIN, T. E.. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Review and update. **Thrombosis Research**, v.118, p.165–176, 2006.

GULÇIN I.; OKTAY, M.; KIREÇCI, E.; & KUFREVIOGLU, O . I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v.83, p.371–382, 2003.

GULÇIN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S; ELMASTAS, M.; KUFREVIOG_LU, O. I. **Food Chem.**, v.87, p.393, 2004.

GUTTERIDGE, J. M. C & HALLIWELL, B. “The deoxyribose assay: an assay both for “free”hydroxyl radical and site-specific hydroxyl radical production”, **Biochem J**. v.253, p.932-933, 1988.

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**; v.186: p.1-85. 1990.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C.. "Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts", **FEBS Letters**, v.128, p.347-352, 1981.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem**, v.59, n.1, p.609-23, 1992.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. New York: Oxford University, 1999. 936 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**. v.246, p.501-14, 1986.

HENRIQUES, M. G. M. O. *et al.* Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Res.** v. 20, p.243-249, 1987.

HEO *et al.* Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. **Bioresource Technology**, v.96, p. 1613–1623, 2005.

HIRSH, J. New anticoagulants. **American Heart Journal**, v.142, p.S3–S8, 2001.

HOLMES, B.; PAGE, A. R.; GOOD, R. A. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. **J Clin Invest**, v.46, p.1422–1432, 1967.

IMESON, A. P. Carrageenan. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), **Handbook of hydrocolloids**, p.87–102. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, 2000.

ISHIZAKA S, HASUMA T, OTANI S, MORISAWA S. Lymphocyte activation by purified carrageenan. **J Immunol**. V. 125, p. 2232–5, 1980.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biol. Med.**, v.9, p.515-540, 1990.

JOHNELL, M.; ELGUE, G.; LARSSON, R.; LARSSON, A.; THELIN, S.; & SIEGBAHN, A. Coagulation, fibrinolysis, and cell activation in patients and shed mediastinal blood during coronary artery bypass grafting with a new heparin-coated surface. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.124, p.321–332, 2002.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2001). **Compendium of Food Additives Specifications**, Addendum 9: FAO food and nutrition paper No. 52 (pp. 192–194) Rome: FAO.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2007). **JECFA Sixty-eighth Meeting: summary and conclusions**. Geneva, June 19–28, 2007. <http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/jecfa68_final.pdf/> acessado em 11 de janeiro de 2010.

JENNY NS & MANN KG. Coagulation cascade: an overview. In: LOSCALZO J & SCHAFER AI, eds. **Thrombosis and hemorrhage**, 2nd ed, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 3-27, 1998.

KAKKAR, AK., LEFER, D.J. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 154-158,2004

KAUL, N.; SIVESKI-ILISKOVIC, N.; HILL M, SLEZAK J, SINGAL PK. Free radicals and the heart. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.30, p.55-67, 1993.

KEEL, M. AND TRENTZ, O. Pathophysiology of polytrauma. **Injury**, v.36, p.691–709, 2005.

KOLENDER, A. A., MATULEWICZ, M. C. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. **Carbohydrate Research**, v.33, p.757–68, 2002.

KUDA, T.; TANIGUCHI, E.; NISHIZAWA, M.; ARAKI, Y. Fate of water-soluble polysaccharides in dried *Chorda filum* a brown alga during water washing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.15, p.3–9, 2002.

KUMAR D. and JUGDUTT B. I. Apoptosis and oxidants in the heart. **J Lab Clin Med Volume**, v.142, n.5, 2003.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v.46, p.244–282, 2007.

LAUGHTON, M.J.; et.al.. “Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossipol and myricetin”, **Biochem. Pharmacol.**, v.38, p.2859-2865, 1989.

LAW, S. K. A; REID, K. B. M. **Complement. Oxford**, Ilpress,72 p. 1988

LEHNINGER - Principles of Biochemistry, Eds: Nelson D.L. & Cox, M.M., 4ª edição, Worth Publishers, 2005 - capítulo 2, Carbohydrates and Glycobiology, p. 241.

LEVI, M. Cell surface-targeted in systemic infection and inflammation. **Blood**. V. 104, p. 1231-1232, 2004.

LEVY, J.H. The human inflammatory response. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v.27 (supl. 1) p.S31-S37, 1996.

LIN, W.W., KARIN, M., A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer, *J. Clin. Invest.* v.117, p.1175–1183, 2007.

LIU CHUN-HUI, WANG CHANG-HAI , XU ZHI-LIANG, WANG YI. Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water. *Process Biochemistry*, v.42,p.961–970, 2007.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C., Inflammation, a key event in cancer development, *Mol. Cancer Res.*, v.4, p.221–233, 2006.

MACFARLANE, R.G., An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, v.202, p.498– 499, 1964.

MACIEJ, M. *et al.* Complement and coagulation: strangers or partners in crime?. *TRENDS in Immunology*, v.28 n.4, 2007.

MANUEL, A. C. *et al.*, Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v.37 p.241–248, 1998.

MARCHETTI, M.; PISANI, S.; PIETROPAOLO, V.; SEGANTI, L.; NICOLETTI, R., & ORSI, N. Inhibition of herpes simplex virus infection by negatively charged and neutralcarbohydrate polymers. *Journal of Chemotherapy* (Firenze, Italy), v.7, p.90–96, 1995.

MARKIDES, S. Therapeutic Inhibition of the Complement system. *Pharmacological Reviews*, v.50, p.59-87, 1998.

MARLAR, R.A.; KLEISS, A.J.; GRIFFIN, J.H., An alternative extrinsic pathway of human blood coagulation. *Blood*, v.60, p.1353–1358, 1982.

MATIAS, W. G. Algas. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, v. 2, n.8, p. 16-17, 1999.

MAYER, A. M. S. & HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2000: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*, v.6, p.37–52., 2004.

MAYER, A. M. S., & HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001–2: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other

miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology. C-Toxicology & Pharmacology*, v.140, p.265–286, 2005.

MAYER, A. M. S., & HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology. C-Toxicology & Pharmacology*, v.145, p.553–581, 2007.

MAYER, A. M. S.; & HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 1999: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, antiinflammatory, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology. C-Toxicology & Pharmacology*, v.132, p.315–339, 2002.

MARZOCOO et al., Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *European Journal of pharmacology*. V. 484, p. 341-350, 2004.

MAZUMDER S., GHOSAL P. K., PUJOL C. A., CARLUCCI M. J., DAMONTE E. B., RAY B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules*, v.31, p.87-95, 2002.

McCANDLESS, E.L. & CRAIGIE, J.S. *A. Rev. Plant Physiol.* v. 30, p.41-53, 1979.

MCLEAN, J. The discovery of heparin. *Circulation*, v.19, p.75–78, 1959

MELO, M.R.S., FEITOSA, J.P.A., FREITAS, A.L.P., DE PAULA, R.C.M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers*, p.491-498, 2002.

MICHEL, O.; LEVAN, T.D.; STERN, D.; DENTENER, M.; THORN, J.; GNAT, D.; BEIJER, M.L.; COCHAUX, P.; HOLT, P.G.; MARTINEZ, F.D.; RYLANDER, R. Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphism in the toll-like receptor 4 gene in human beings. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.112, p.923-9, 2003.

MIKI C., INOUE Y., ARAKI T., UCHIDA K., KUSUNOKI M., Cytokines and cancer development, *J. Surg. Oncol.* V.95, p.10–11., 2007.

MORENO, C. S.. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological. *Food Sci Tech Int*, v.8, n.3, p.121–137, 2002.

MORRIS CHRISTOPHER, J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v.225, p.115–121. 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **J Immunol Methods**. v.65 p. 55–63, 1983.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M. C.; ABILDGAARD, U. **J. Biol. Chem.** v.271, p.23973–23984, 1996.

MUNRO J. M. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. **Eur. Heart J.** 14 Suppl K:72-7, 1993.

NAGAI, T., YUKIMOTO, T., Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. **Food Chemistry** v.81, p.327–332. 2003.

NAITO, K.; FUJIKAWA, K., Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces, **J. Biol. Chem.**, v.266, p.7353–7358, 1991.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v.420, p.846–852, 2002.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N.; **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.338, p.668, 2005.

NISHIMOTO, N. & KISHIMOTO, T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. **Curr Opin Pharmacol**, V.4, p.386-391. 2004.

NOSEDA, M. D. **Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetrasporófitas de gigartina skottsbergu**. 1994. 180f. Tese (doutorado em Bioquímica). Departamento de bioquímica univarsidade federal do Paraná. Curitiba, 1994.

OGINO, T. & OKADA, S. "Oxidative damage of bovine serum albumin and other enzyme proteins by iron-chelate complexes", **Bioch. Biophys. Acta** v.1245, p.359-365, 1995.

OLIVEIRA, A. C; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.L.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S.: Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quím. Nova**, v.32 n.3 São Paulo, 2009.

OSTERUD, B. & RAPAPORT, S.I. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.74, p.5260– 5264, 1977.

PABLO RIUL, LACOUTH, P.; PAGLIOSA, P. R.; CHRISTOFFERSEN, M. L. ; HORTA, P. A. Rhodolith beds at the easternmost extreme of South

America:Community structure of an endangered environment. **Aquatic Botany**. V. 90. p. 315–320, 2009.

PÁDUA, M.; FONTOURA, P. S. G.; MATHIAS, A. L. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 49-55, 2004.

PAL YU B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Ver.**,v.74, p.139-62, 1994.

PANLASIGUI, L. N.; BAELLO, O. Q.; DIMATANGAL, J. M.; & DUMELOD, B. D. Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.12, p.209–214, 2003,

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

PEREIRA, F.E.L; BOGLIOLO,L. **Inflamações In: Patologia**. 2nd.1998.cap7, p.112-148.

PEREIRA, L. Identification of phycocolloids by vibrational spectroscopy. In A. T. Critchley, M. Ohno, & D. B. Largo (Eds.), **World seaweed resources – an authoritative reference system**. ETI Information Services Ltd. 2006.

PEREIRA, M. G. et al. Structure and coagulante activity of sulfated galactan from the red algae *Gelidium grinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2015-2023, 2005.

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

PEREIRA, M. S.; MULLOY, B.; & MOURAO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 7656–7667, 1999.

PEREIRA, M. S.; MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.7656–7667, 1999.

PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I.H.; ROSS, D.A.; TODD, E.W.; WARDLAW A.C. The properdin system and immunity: I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. **Science** v.120, p.279-51. 1954

PLATTS- MILLS, T. E. ; ISHIZAKA, K. Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. **J. Immunol**. v. 113, p. 348-358, 1974.

POMIN, V. H. e MOURÃO, P. A. S. Carboidratos. **Ciência Hoje**, p. 26-31, 2006.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v.30, n.4, p.277-290, 1995.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

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 E1. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337–341, 1999.

RAMAVATAR MEENA, KAMALESH PRASAD, A.K. SIDDHANTA. Development of a stable hydrogel network based on agar– kappa-carrageenan blend cross-linked with genipin. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.497– 509, 2009.

REITH, M. Molecular biology of rhodophyte and chromophyte plastids. **Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Bio.**, v. 46, p. 549-575, 1995.

RESS, D.A. **Carbohydr. Chem.** v.24. p.267-332, 1969.

ROCHA, et al. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. *Infarma – Farmacia Brasileira*. v. 16, p. 82 – 87, 2004.

ROCHE APPLIED SCIENCE. Methods for studying cell proliferation and viability in cell populations. **Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation**. 3rd edition, p.84, 2008

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**.1999, 5ed.

ROMANI, L. et al. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. **Nature**, v.451, p.211–215, 2008.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *In* Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 1991, p.151-70.

ROY, P.; KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v.34, n.6, p.563-570, 1996.

SALVEMINI, D. *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.** v.118, p.829-838, 1996.

SAMMONS, J. M. *et al.* Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. **Brain Research**, v. 876, p.48-54, 2000.

SCHÄPPI MG; JAQUET, V; BELLI, D. C.; KRAUSE, K.H. Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. **Semin Immunopathol**, v.30, p.255–271, 2008.

SCHEINBERG, M. A. A new interleukin to treat arthritis: anti-interleukin-6
Revendo Ciências Básicas. V.7(1 Pt 1), p.108-11, 2009.

SCHNEIDER, C. D. & OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**., v.10, n.4, 2004.

SCHROEDER, B. *et al.* Species specificity of plasminogen activation and acquisition of surface-associated proteolytic activity by group C streptococci grown in plasma. **Infect. Immun.**, v.67, p.6487–6495,1999.

SCHWARZ, K., BERTELSEN, G., NISSEN, L.R., GARDNER, P.T., HEINONEN, M.I., HOPIA, A., HUYNH-BA, T., LAMBELET, P., MCPHAIL, D., SKIBSTED, L.H., TIJBURG, L., Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging. Lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. **European Food Research and Technology**, v.212, p.319–328. 2001.

SEKKAL M.; LEGRAND P.; HUVENNE J.-P.; VERDUS M.C., **J. Mol. Struct.** v. 294, p. 227, 1993.

SHANMUGAN, M. & MODY, K. H. **Current Science**, v.79. p.1672-1683, 2000.

SHANMUGAN, M. & MODY, K. H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as pontecial blood anticoagulant agents. **Currente Science**, v. 79 (12), p. 1672-1683, 2000.

SHON, M. Y.; KIM, T. H.; SUNG, N. J. **Food Chem.**, v.82, p.593. 2003

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SILVA, F.R.F.; DORE, C.M.P.G.; MARQUES, C.T.; NASCIMENTO, M.S.; BENEVIDES, N.M.B.; ROCHA; H.A.O.; CHAVANTE, S.F.; LEITE, E.L.. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v.79,p.26–33, 2010.

SILVA, F. R. F, **Estudo comparativo de carragenanas comerciais kappa, iota e lambda no processo inflamatório em ratos: edema intraplantar**

pleurisia. Dissertação (mestrado em bioquímica) Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Natal, 2005

SILVA, S. S. et al., Extração e Caracterização de Xilanas de Sabugos de Milho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** - Abr/Jun, 1998

SILVA, T. M. A., **Extração e caracterização estrutural de polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Padina gymnospora*. Dissertação** (mestrado em bioquímica) Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Natal, 1999.

SILVA, T.M.A. et al., Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38. p. 523-533, 2005.

SILVA, W. D, KIPNIS, T. L. Sistema complemento: um engenhoso mecanismo bioquímico, um co-participante na defesa natural e um mediador de interações celulares. **Rev Ass Med Brasil.**, v.30, p.67-72, 1984

SMITH, C.; HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. **Food Chem. Toxicol.**, v.30, p.483–489. 1992,

SONG H.; ZHANG Q.; ZHANG, Z.; WAN, J.. In vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Bryopsis plumosa*. **Carbohydrate Polymers**, v.80, n.4, p.1057-1061, 2010.

SOUZA , M. B. , PIRES, K. M. S., ALENCAR, D. B., SAMPAIO, A. H., SAKER-SAMPAIO S. *α - and β -carotene, and α -tocopherol in fresh seaweeds.* **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.28(4), p.954-959, 2008.

SOUZA, M. C. R. DE; MARQUES, C. T.; DORE, CELINA M. G.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J Appl Phycol.**, 1v.9, p.153–160. 2007.

SOUZA L. A. R. **Caracterização química parcial e atividades farmacológicas de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha *Amansia multifida*.** (Monografia do curso de Farmácia) Universidade Federal do Rio Grande do Norte- Natal, 2007.

SPECTOR, J. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50 μ g of protein. **Anal. Biochem.** v. 86, p.142-143, 1978.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. **Cell**, v.28; n.76(2), p.301-314. **1994**.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, New York, v.46, p.S14-S18, 1997. Supplement 2.

STANLEY, N. Production and utilization of products from commercial seaweeds. In **D. J. McHugh (Ed.), FAO fisheries technical paper**, v.288, p. 116–146, Rome: FAO. 1987.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**.1998, 2ed.

STILLER, J.W. & HALL, B.D. The origin of the red algae: implications for plastid evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 4520-4525, 1997.

STONE, M. E., & SHORE-LESSERSON, L. Present and future anticoagulants. **Advances in Anesthesia**, v24, p.29–66, 2006.

SUN, H. The interaction between pathogens and the host coagulation system. **Physiology (Bethesda)**, v.21, p.281–288, 2006.

TADOLINI, B. & CABRINI, L.. “On the mechanism of OH· scavenger action”, **Biochem J.** v.253, p.931-932. 1988.

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

TANG, S.; SHEEHAN, D.; BUCKELY, D.J.; MORRISSEY, P.A.; KERRY, J.P.,. Anti-oxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v.36, p.685–692, 2001.

TIIDUS, P.M., BEHUNS, W.A.; MADERE, R. Effects of vitamin E status and exercise training on tissue lipid peroxidation based on two methods of assessment. **Nutrition Research**, Elmsford, v.13, p.S189-S193, 1993. Supplement.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; TUCKOVA, L.; STEPANKOVA, R.; HUDCOVIC, T.; PALOVA- JELINKOVA, L.; KOZAKOVA, H.; ROSSMANN, P.; SANCHEZ, D.; CINOVA, J.; HRNCU, T.; KVERKA, M.; FROLOVA, L.; UHLIZ, H.; POWRIE, F.; BLAND, P. Involvement of innate immunity in the development diseases. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1051, p.787-798. 2005.

TRAVIS, J.T. Biotech gets a grip on cell adhesión. **Science** v. 26, p. 906-915,

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. –Detection of sigars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444 – 445, 1950.

VAN DE VALDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydr. Res.** v.339, p.2309-2313, 2004.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. L.; ROLLEMA, H. S.; & CERESO, A. S. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.73–92. 2002.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

WAHL, S. M.; FEDMAN, G. M.; MC CRTHY, J. B. Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. **J. Leukoc. Biol.**, v.59(6), p.789-796. 1996.

WANASUNDARA, U. N.; & SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, v.63, p.335-342, 1998.

WATT, J., MARCUS, R. Experimental ulcerative disease of the colon in animals. **Gut**, v.4, p.06-10, 1973.

WEIJL, N.I.; CLETON, F.J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, London, v.23, n.4, p.209- 240, 1997.

WELCH KD, DAVIS TZ, VAN EDEN ME, AUST SD. **Deleterious ironmediated oxidation of biomolecules**. *Free Radical Biol. Med*; 32 : 577-83, 2002.

WILLIAMS, L.M.; RIDLEY, A.J. Lipopolysaccharides induce actin reorganization and tyrosine phosphorylation of PyK2 and Paxilin in monocytes and macrophages. **J. Immunol**, v.164, p.2028-36, 2000.

WINKELSTEIN JA, *et al.* Chronic granulomatous disease: Report on a national registry of 368 patients. **Medicine** (Baltimore), v.79, p.155–169, 2000.

WINTER, CA, RISLEY, EA, NUSS, GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med.dec.**, v111, p.544-547, 1967.

WITZUM, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, London, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

YAMAGUCHI, F.; ARIGA, T.; YOSHIMIRA, Y.; NAKAZAWA, H. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.180, 2000.

YANG L. & ZHANG L. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.349–361, 2009.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. **J. Agric. Food Chem.** V.43, p.27–32, 1995.

YUAN, H.; SONG, J.; ZHANG, W.; LI, X.; LIA, N. AND GAOA; X. Antioxidant activity and cytoprotective effect of *j*-carrageenan oligosaccharides and their different derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p.1329–1334, 2006.

YUAN, H.; ZHANG, W.; LI, X.; LU, X.; LI, N.; GAO C.; E SONG, J. Preparation and in vitro antioxidant activity of *j*-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, v.340, p.685–692, 2005.

ZHANG Z.; WANG, F.; WANG, X.; LIU, X.; HOU, Y.; ZHANG, Q. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v.82, n.1, p118-1212, 2010.

ZHANG, E. X; YU, L. J. Studies on polysaccharide from *Sargassum Thunberg* II for its ability to scavenge active oxygen species. **Chin J Mar Drugs**, v.3, p.1–4. 1997.

ZHANG, J. et al. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Pophyra Laitanesis* (Rhodophyta) in agina mice. **Pharmacological researcha**. v. 48, p. 151-155, 2003.

ZHANG, Q. B.; YU, P. Z.; LI, Z. E.; ZHANG, H.; XU, Z. H.; & LI, P. C. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*. **Journal of Applied Phycology**, v.15, p.305–310, 2003.

ZHAO, T. T.; ZHANG, Q. B.; QI, H. M.; ZHANG, H.; NIU, X. Z.; XU, Z. H., *et al*. Degradation of porphyran from *Porphyra haitanensis* and the antioxidant activities of the degraded porphyrans with different molecular weight. **International Journal of Biological Macromolecues**, v.38, p.45–50, 2006.

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

ZHOU, Y-C e ZHENG, R-L. Phenolic compounds and analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. **Biochemical Pharmacology**, 1991, vol.42, n°6, p. 1177-1179.

ZIBETTI, R. G. M.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. A, COLODI, F. G.; DUCATTI, D. R. B.; FERREIRA, L. G., CARDOSO, M. A., CEREZO, A. S. Galactans from *Cryptonemia* species. Part II: Studies on the system of galactans of *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales) and on the structure of major fractions. **Carbohydrate Research**, v.344, p.2364–2374, 2009.

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

ZHOUA G., SUNC Y, HUA XIN C, ZHANG C Y, LI A Z, XUA Z,. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 47–53, 2004.

ANEXO I

Parecer da Comissão de ética no uso de animais - CEUA



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 048/2009

Professor/Pesquisador: *EDDA LISBOA LEITE*

Natal (RN), 30 de março de 2010.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto "INVESTIGAÇÃO QUÍMICA PARCIAL E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA *Amansia multifida*", **protocolo nº 048/2009**, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **Outubro de 2010** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,


Elaine C. Gavioli
Presidente da CEUA



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 048/2009

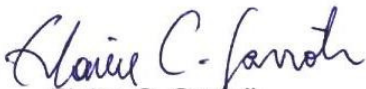
Professor/Pesquisador: *EDDA LISBOA LEITE*

Natal (RN), 03 de maio de 2010.

Prezado Professor/Pesquisador,

Vimos, através deste documento, informar que encontra-se em anexo o parecer emitido pela CEUA a respeito do adendo do projeto que tem como título "INVESTIGAÇÃO QUÍMICA PARCIAL E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA *Amansia multifida*" encaminhado a esta comissão e devidamente identificado através do **protocolo n° 048/2009**. O referido adendo do projeto foi considerado APROVADO para execução pela CEUA.

Atenciosamente,


Elaine C. Gavioli
Presidente da CEUA

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](#)