

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA PONTAROLLO DAL SANTOS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE CARRAGENANAS E SUAS
PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES

CURITIBA

2021

BÁRBARA PONTAROLLO DAL SANTOS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE CARRAGENANAS E SUAS
PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Federal do Paraná como
requisito à obtenção do título de Biomédico.

Orientador: Diogo Ricardo Bazan Ducatti.

CURITIBA

2021

TERMO DE APROVAÇÃO

BÁRBARA PONTAROLLO DAL SANTOS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE CARRAGENANAS E SUAS PROPRIEDADES ANTICOAGULANTES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de grau de Bacharel em Biomedicina, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti.
Orientador - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

Prof. Dra. Franciely G. Colodi
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, UEL.

Curitiba, 15 de dezembro de 2021.

À minha família e São José.

AGRADECIMENTOS

À Sagrada Família e meu Anjo da Guarda, por sustentarem o meu coração e por me presentear com inúmeras consolações;

Aos meus pais, meus três irmãos e ao tio Orlando por serem minha rocha firme, meu apoio e por me doarem tanto amor em cada pequeno instante da minha vida. Ao meu namorado e toda minha família por zelarem por mim com carinho, amor e dedicação. Obrigada por confiarem nos meus sonhos e no meu coração;

Aos meus amigos, que me fizeram mais alegre e feliz, tornando as responsabilidades, um fado suave;

Ao Prof. Dr. Diogo R. B. Ducatti, por ter sido meu orientador e por ter me acolhido desde o primeiro ano da faculdade, ensinando-me a trabalhar com ciência e a amar fazer isto;

Aos meus amigos de graduação, em especial à Camila Laís, que me estendeu a mão e sempre esteve ao meu lado nestes quatro anos;

Aos meus colegas de laboratório Janaína, Gislaine e Edson. Em especial à Manoella, que se tornou uma grande amiga. Obrigada por me ajudar em minhas batalhas e ficar tão genuinamente feliz pelas minhas conquistas!

À banca examinadora composta pelos professores Dr. Thales Ricardo Cipriani e Dra. Franciely G. Colodi, obrigada pela disponibilidade de tempo e atenção na avaliação do meu trabalho.

“Não há beleza apenas nesta dimensão, em um centímetro; também há beleza em dimensões menores, a estrutura interna, também os processos. O fato de que as cores de uma flor evoluíram para atrair insetos para polinizá-la é interessante; isso significa que os insetos podem ver a cor. Isso acrescenta uma questão: esse sentido estético também existe nas formas inferiores? Por que é estético? Todos os tipos de questões interessantes que o conhecimento da ciência apenas acrescenta à excitação, ao mistério e ao espanto de uma flor. Isso apenas adiciona. Não entendo como subtrai.”

Richard Feynman.

RESUMO

Carragenanas são galactanas sulfatadas extraídas de algas marinhas vermelhas. A estrutura das Carragenanas é composta por unidades de β -D-galactopiranosose 3-ligadas e α -D-galactopiranosose 4-ligadas. As principais Carragenanas estudadas e usadas comercialmente são λ -, κ - e ι -Carragenana. A estrutura das Carragenanas é atrelada às suas propriedades físicas e, por isso, é requisitada nas indústrias farmacêutica, alimentícia, têxtil e cosmética. Esta estrutura pode ser caracterizada por métodos químicos, cromatográficos e espectroscópicos. As Carragenanas apresentam atividade anticoagulante, interferindo no sistema de coagulação sanguínea. Este sistema é um processo interligado que envolve diversas fases e resulta na formação de coágulo. As Carragenanas interferem no sistema de coagulação principalmente pela inibição do fator IIa e fator Xa pela ação da antitrombina, de maneira semelhante à Heparina. Entre as Carragenanas, a λ -Carragenana possui a melhor atividade anticoagulante. Porém, é possível aprimorar a ação anticoagulante das Carragenanas por modificações químicas como oxidação, sulfatação ou via a produção de oligossacarídeos. Nesta revisão, foram abordados assuntos como uma visão histórica do conhecimento das Carragenanas, suas características estruturais e suas aplicações, o sistema de coagulação sanguínea, a ação das Carragenanas na atividade anticoagulante e maneiras possíveis de aprimorar esta atividade.

Palavras-chave: Carragenanas, anticoagulante, modificações químicas.

ABSTRACT

Carrageenans are sulfated galactans extracted from red seaweeds. The structure of carrageenans is composed of 3-linked β -D-galactopyranose and 4-linked α -D-galactopyranose units. The main carrageenans studied and used commercially are λ -, κ - and ι -carrageenan. The structure of carrageenans is related to their physical properties and, therefore, they are required in the pharmaceutical, food, textile and cosmetic industries. Carrageenan structure can be characterized by chemical, chromatographic and spectroscopic methods. These polysaccharides have anticoagulant activity, interfering with the blood coagulation system, which is an interconnected process that involves several stages and results in the clot formation. Carrageenans interfere in the coagulation system mainly by inhibiting both factors IIa and Xa by the action of antithrombin, which is similar to the heparin mechanism. Among the carrageenans, λ -carrageenan shows better anticoagulant activity. However, it is possible to improve the anticoagulant action of carrageenans using chemical modifications, such as oxidation, sulfation or by producing oligosaccharides. In this review, it was discussed a historical view of the knowledge about Carrageenans, their chemical characteristics and applications, the coagulation system, the role of Carrageenans in the anticoagulant activity and possible ways to improve their activity.

Key words: Carrageenans, anticoagulant, chemical modifications.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA GERAL DAS GALACTANAS.....	13
FIGURA 2 - ESTRUTURA GERAL DAS CARRAGENANAS.....	15
FIGURA 3 - ESPECTRO DE ¹ H DE κ-CARRAGENANA EXTRAÍDA DA ALGA <i>Kappaphycus alvarezii</i>	19
FIGURA 4 - ESQUEMA CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.....	22
FIGURA 5 - ESQUEMA MODERNO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.....	25

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	CARRAGENANAS - ESTRUTURA, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES....	12
3.	SISTEMA DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	20
4.	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DAS CARRAGENANAS.....	27
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
6.	REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as doenças mais letais no mundo. Os eventos tromboembólicos estão entre as principais causas destas doenças devido à formação de trombos no sistema circulatório (MOURÃO et al., 2015). No Brasil, os eventos tromboembólicos marcaram uma presença mais importante com a infecção pela síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (CUNHA et al., 2021). Tal fato ressalta a importância do uso de anticoagulantes, como a Heparina, muito aplicada na clínica. Porém, diversos efeitos adversos estão relacionados à administração contínua desse fármaco (ALBANI et al., 2011), além da possibilidade de contaminação, como por microrganismos, devido a sua origem animal. Dessa forma, torna-se fundamental o estudo de moléculas com potencial atividade anticoagulante, conhecidas como miméticos da Heparina. As Carragenanas são polissacarídeos naturalmente sulfatados, extraídos de algas marinhas vermelhas, que têm mostrado potencial atividade anticoagulante. Na estrutura das Carragenanas há grupamentos sulfato, relatados como essenciais para a ação anticoagulante. Em acréscimo, as Carragenanas são passíveis de modificações químicas, as quais podem alterar sua atividade. Entre as Carragenanas, destacam-se principalmente três tipos: *Iota*-, *Lambda*-, e *Kappa*-Carragenana, que possuem dois, três e um grupamento sulfato por repetição dissacarídica, respectivamente. Nesta revisão foi dissertado sobre as características estruturais das Carragenanas, suas propriedades, aplicações e ferramentas de análise. Além disso, foi abordado o sistema de coagulação com a cascata clássica de coagulação e também com um panorama mais moderno e integrado deste sistema. Por fim, foi discorrido sobre a ação anticoagulante das Carragenanas e possíveis maneiras de aprimorar esta atividade.

2. CARRAGENANAS - ESTRUTURA, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

Carragenanas são galactanas sulfatadas sintetizadas em larga escala devido a sua aplicação em diversas áreas da indústria (USOV et al., 2011). As galactanas sulfatadas são os principais componentes contidos nas algas conhecidas como vermelhas, que são organismos fotossintéticos com alta complexidade. As algas podem ser divididas em dois grupos principais, de acordo com o tamanho: as microalgas e macroalgas. Microalgas são pequenas algas encontradas geralmente em ambientes bentônicos e litorâneos como fitoplâncton, enquanto as macroalgas são algas marinhas maiores encontradas geralmente na zona litorânea. As algas marinhas são organismos multicelulares e sua biomassa é um potencial recurso para gerar produtos bioquímicos muito requisitados (ZIA et al., 2016). Essas algas são classificadas em três grupos: as *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas marrons) e *Rhodophyceae* (algas vermelhas) (KUMAR et al., 2021). Dessas, as algas vermelhas são a divisão mais antiga (USOV et al., 2011) e contém cerca de 7.000 espécies (KUMAR et al., 2021), que se diferenciam entre si pela composição de polissacarídeos na sua matriz intercelular. Dentre os polímeros, as galactanas sulfatadas são os principais polissacarídeos contidos na matriz intercelular e na parede celular não fibrilar. Aqui destaca-se o acentuado interesse nas algas pois essas galactanas possuem grande capacidade de formação de géis rígidos e soluções viscosas, características essenciais para as indústrias relacionadas à produção de alimentos, papeis, têxteis ou até mesmo à extração de petróleo (STORTZ et al., 2005).

A investigação das galactanas de algas vermelhas começou em meados do século XX, a partir do isolamento da agarose, a qual teve sua estrutura determinada por completo apenas em 1956. Foi realizado o fracionamento de Carragenanas em 1953 devido ao interesse no monossacarídeo 3,6-anidrogactose, encontrado como componente exclusivo dos polissacarídeos de algas vermelhas e provável responsável pelo comportamento químico destes biopolímeros. Essas investigações iniciais resultaram em uma maior análise estrutural de galactanas por meio de métodos químicos, físico-químicos e enzimáticos, permitindo maior conhecimento das estruturas de galactanas como as Carragenanas (USOV et al., 2011). É

possível observar essas evoluções no conhecimento da estrutura das Carragenanas na carta escrita por Smith, D. B; Cook, W. H. (1953), a qual descreve como ocorreu o fracionamento desses polissacarídeos utilizando a precipitação com KCl. Porém, as Carragenanas têm sua história conhecida desde 1837, quando foram isoladas pela primeira vez (LIU et al., 2015), e por eventos como o de 1844, quando Schmidt extraiu a mucilagem de *Chondrus crispus* ("Carragheen"). Nesta época, a Carragenana era conhecida como "musgo carragheen", "musgo irlandês" ou "carragenina". A partir de então, foram produzidas mais informações acerca da estrutura deste polissacarídeo e seus componentes (STORTZ et al., 2005). O nome Carragenana vem do nome coloquial irlandês que era dado à alga vermelha: Carragenana, que significa "pequena pedra", devido ao aspecto de sua alga de origem (CAMPO et al., 2009). Durante a investigação das Carragenanas, alguns marcos importantes podem ser enfatizados. Como na década de 1960, quando foi declarado que a Carragenana se tratava de uma família de diversas estruturas e não de um único tipo de composto. Esse conhecimento foi possível depois da separação de dois componentes, a *Kappa*- da *Lambda*-Carragenana, na presença de íons de potássio. Esse acontecimento levou à determinação estrutural correta de *Kappa*-Carragenana e, mais tarde, da *Lambda*-Carragenana, sob liderança de David Rees. A partir de então, novas estruturas de Carragenanas foram também elucidadas. Outro marco importante para o estudo desses polissacarídeos aconteceu na década de 1970, ao ser observado que diferentes momentos do ciclo de desenvolvimento das algas influenciam na estrutura das Carragenanas produzidas. Assim, foi demonstrada a necessidade de classificar as algas por seu ciclo de vida antes de estudar seus polissacarídeos. Também foi proposta a classificação das Carragenanas em famílias conforme sua estrutura química relacionada ao padrão de sulfatação (STORTZ et al., 2005).

As galactanas sulfatadas encontradas nas algas marinhas possuem uma estrutura linear constituída de unidades alternadas de β -D-galactopiranosose 3-ligada e α -galactopiranosose 4-ligada (Figura 1). Os resíduos 4-ligados podem estar presentes como derivados 3,6-anidro- α -galactopiranosose, em parte ou

completamente. Além disso, esses resíduos são formados a partir da eliminação simultânea de um grupo sulfato em C6 e um próton do grupo 3-OH (USOV et al., 2011).

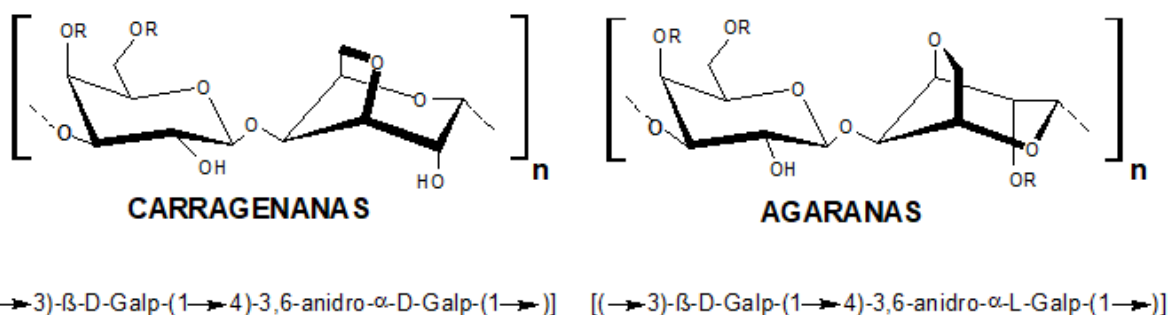


Figura 1: ESTRUTURA GERAL DAS GALACTANAS (R=SO₃⁻ ou H).

FONTE: O autor (2021), com base em SANTOS et al. (2015).

As unidades β das galactanas pertencem sempre à série enantiomérica D-, enquanto as unidades α podem pertencer tanto a série D- quanto à L- (STORTZ et al., 2005). As galactanas que contêm unidades α pertencentes à série L- são classificadas como agaranas, enquanto as pertencentes a série D- são denominadas de Carragenanas (Figura 1). Existe ainda um grupo denominado de D-/L- híbridos que contêm unidades α pertencentes tanto à série D- quanto L- (USOV et al., 2011). Assim, nota-se que há uma grande variedade estrutural entre as galactanas. Além disso, diversas características influenciam a estrutura química das galactanas, tais como a espécie de alga produtora, os ambientes onde as algas se encontram e até mesmo os diferentes períodos do ano em que são coletadas (PEREIRA et al., 2005).

As Carragenanas possuem cerca de 15 a 20% de conteúdo de éster-sulfato, o que as caracteriza como polissacarídeos aniônicos (Figura 1) (ZIA et al., 2016). De acordo com os diferentes padrões de sulfatação, diversas estruturas de Carragenanas podem ser encontradas, entre estas estão: ι-, κ-, λ-, μ-, ν- e θ-Carragenana (CAMPO et al., 2009). A κ-Carragenana pode ser produzida a partir da μ-Carragenana por tratamento alcalino, assim como ι- e θ-Carragenana a partir

de ν - e λ -Carragenana, respectivamente (Figura 2) (AHMED et al., 2014). Entres os tipos de Carragenana, κ -, ι - e λ -Carragenana se destacam (ZHU et al., 2018).

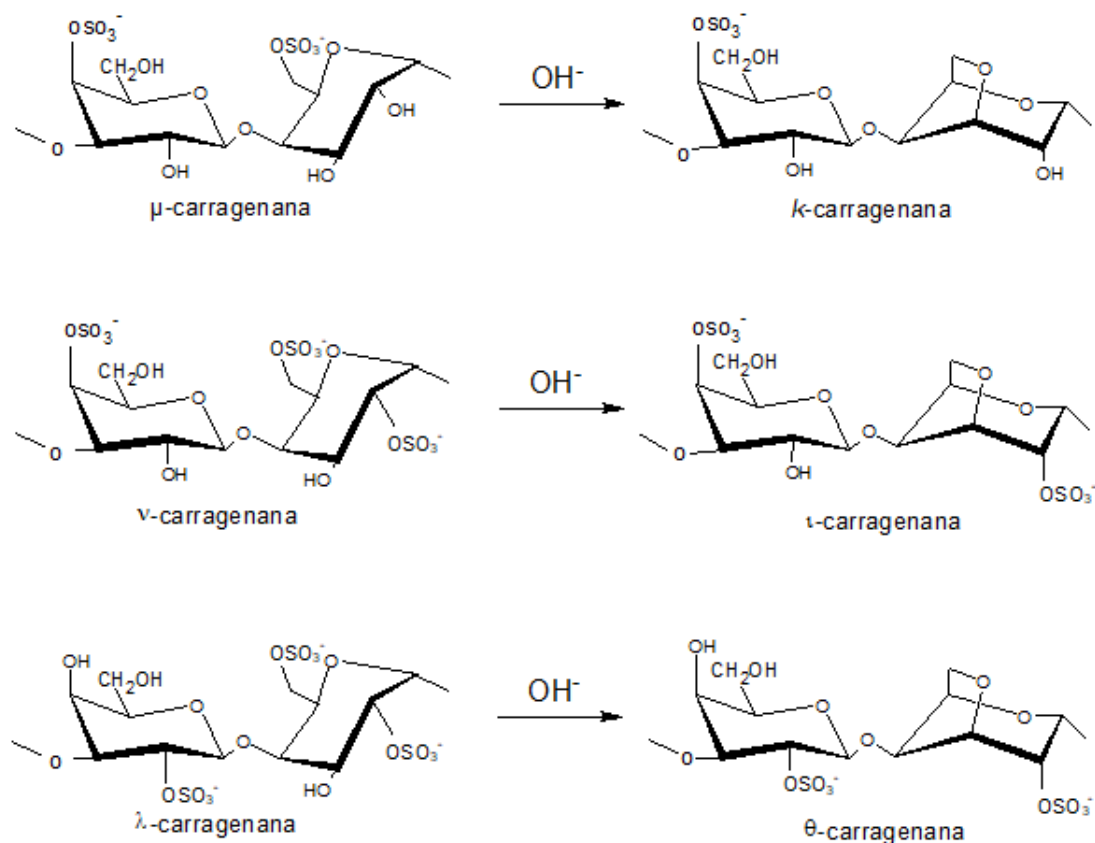


Figura 2: ESTRUTURA GERAL DAS Carragenanas.
 FONTE: O autor (2021), com base em AHMED et al. (2014).

A κ -Carragenana é composta por repetições dissacarídicas de β -D-galactose 4-sulfato (G4S) 3-ligado e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (DA) 4-ligado, com um grupamento sulfato por repetição dissacarídica. A ι -Carragenana tem uma estrutura muito similar, porém, com dois grupamentos sulfato por repetição dissacarídica nas posições 4 da unidade β (G4S) e 2 da unidade α (DA2S). Por fim, a λ -Carragenana possui três grupamentos sulfato por repetição dissacarídica no carbono 2 da unidade β (G2S) e nos carbonos 2 e 6 da unidade α (D2S,6S), não possuindo, dessa forma, uma unidade 3,6-anidro, como ocorre na ι - e κ -Carragenana (ZIA et al., 2016).

λ -, ι - e κ -Carragenanas possuem algumas características em comum. Por exemplo, são muito solúveis em água (ZIA et al., 2016), sendo a λ -Carragenana a

mais solúvel e a κ -Carragenana a menos (NECAS et al., 2013). Em relação às propriedades biológicas, foi demonstrado que estas Carragenanas não foram citotóxicas em experimentos com células NCM460 e análises de viabilidade celular (MCKIM et al., 2013). Assim, foi sugerido que as Carragenanas não são tóxicas pelas vias de exposição oral, dérmica e inalatória, assim como não são irritantes para os olhos nem causam alergias na pele (WEINER et al., 2014). Weiner et al. (2014) também relataram que as Carragenanas, especialmente a λ - e κ -Carragenana, não são degradadas no sistema gastrointestinal, indicando que esses polissacarídeos são, até certo ponto, resistentes às mudanças de pH.

A estrutura química das Carragenanas é atrelada às propriedades físicas, entre elas, a capacidade de gelificação em solução dependente de cátions (RUNNING et al., 2012). κ - e ι -Carragenanas possuem uma grande facilidade de formação de géis porque na presença de cátions formam duplas hélices em suas estruturas que geram uma rede ordenada tornando possível o processo de gelificação. Por outro lado, a λ -Carragenana é conhecida por ser apenas um agente espessante e de alta viscosidade (ZHU et al., 2018), incapaz de formar hidrogéis de forma natural (RUNNING et al., 2012). Foi sugerido por Campo et al. (2009) que isso se dá porque ι - e κ -Carragenanas formam essas redes tridimensionais com duplas hélices resultantes da reticulação das cadeias adjacentes, com os grupos sulfatos orientados externamente. Já os grupos sulfato na posição 2 em λ -Carragenana estão voltados para dentro. Essa orientação impede a reticulação e a formação de uma rede ordenada, que tornaria possível o processo de gelificação. Assim, λ -Carragenana não tem facilidade em formar géis senão por associação com íons trivalentes, como demonstrado, pela primeira vez, por Running et al. (2012).

São justamente estas propriedades gelificantes e espessantes que fazem as Carragenanas serem muito visadas pela indústria (VAN DE VELDE et al., 2002). A indústria alimentícia é uma área que se utiliza muito das Carragenanas para alterar aspectos físicos de produtos como sorvete, iogurte e presunto. Para o uso na indústria alimentícia, a consistência de gel é indispensável, assim, o tratamento alcalino preliminar à extração do polissacarídeo para remover alguma matéria

estranha e, simultaneamente, para modificar os polissacarídeos pode ser um processo utilizado. Neste tratamento alcalino, o grupo sulfato da posição 6 de α -galactopiranosose 4-ligados dá lugar a resíduos de 3,6-anidro- α -galactopiranosose, dessa forma, a capacidade gelificante pode aumentar (USOV et al., 2011). Além da aplicação direta nos alimentos, as Carragenanas podem ser utilizadas para formar uma película antimicrobiana, preservando a validade de frutas, como foi sugerido por Bico et al. (2009).

A indústria cosmética também utiliza as Carragenanas na formulação de gel para banho ou para cuidados com a pele e corpo. Além disso, as Carragenanas possuem atividade antioxidante, importante para a área da estética na formulação de produtos antioxidantes e anti-idade (PIMENTEL et al., 2018). Os estudos de Fu et al. (2020) mostram a potencialidade da indústria têxtil em usar Carragenanas para formar uma película protetora para isolar oxigênio, absorver calor e, portanto, produzir uma nova fibra férrica de Carragenana com propriedade retardadora de chamas (FU et al., 2020). As Carragenanas agem também como agentes de colagem naturais, usados na fabricação de colagem de têxteis, tornando o processo de produção mais sustentável. Outra aplicação das Carragenanas na indústria têxtil são os processos de impressão, lavagem enzimáticas e detergentes para tecidos (KUMAR et al., 2017). Ao passo que mais se soube sobre sua estrutura e potencialidades, as Carragenanas foram usadas primeiramente como agentes espessantes, emulsificantes e estabilizantes na indústria. Porém, a biocompatibilidade, alto peso molecular, alta viscosidade e capacidade de gelificação desses polissacarídeos conferiram alta importância para sua investigação e atingiram o campo da pesquisa médica, farmacêutica e biotecnológica, além da indústria (QUITO et al., 2020). As Carragenanas têm sido avaliadas frente a diversas atividades biológicas, tais como antioxidante (SOLOKOVA et al., 2011), antitumoral (HU et al., 2006), imunoestimulatória (CHENG et al., 2007), antiviral (TISCHER et al., 2006), imunomodulatórias, anti-hiperlipidêmico (CAMPO et al., 2009) e anticoagulante (SANTOS et al., 2019; ARAÚJO et al., 2013). Um exemplo desta importância foi demonstrado no trabalho

de Tang et al. (2012), onde foi observado que as Carragenanas podem ser capazes de ter atividade anti-vírus da influenza, reforçando o potencial farmacológico deste conjunto de polissacarídeos.

Para a aplicação das carragenans, uma etapa importante no seu estudo envolve a extração e caracterização química. Devido à alta hidrofiliabilidade, sua extração é realizada com água, normalmente entre 80-90 °C. O tratamento prévio da biomassa de alga, antes da extração, pode ser feito com ácido diluído, considerando que, assim, os cátions polivalentes são retirados, facilitando a extração de polissacarídeos. Neste caso, é necessário ter cuidado com a possível degradação dos polissacarídeos contidos na alga e é sugerido o uso de um tampão na extração ou um tratamento alcalino preliminar (USOV et al., 2011). As Carragenanas são geralmente extraídas de algas do gêneros *Agardhiella*, *Chondrus*, *Eucheuma*, *Furcellaria*, *Gigartina*, *Hypnea*, *Iridaea*, *Sarconema*, e *Solieria* (QUITO et al., 2020).

Beaumont et al., (2021) sugere que a caracterização de Carragenanas pode ser feita na escala molecular e macromolecular. A escala molecular se dá pela análise minuciosa da composição e estrutura da galactana (BEAUMONT et al., 2021). Normalmente, é realizada uma avaliação monomérica da molécula por uma hidrólise ácida para que, assim, as unidades galactose e 3,6-anidro-galactose, bem como os grupos sulfato sejam liberados para uma análise quantitativa. O método mais utilizado na análise quantitativa de monossacarídeos após hidrólise é a cromatografia gás-líquido (GLC) para identificação monossacarídica por uma relação massa/carga (USOV et al., 2011) acoplada a espectrômetros de massa. Essas ferramentas, em conjunto, possibilitam a detecção por meio da contagem de íons. A etapa de derivatização envolve redução e acetilação dos monossacarídeos e é importante para aumentar a volatilidade dos monossacarídeos na análise por cromatografia gasosa (BEAUMONT et al., 2021). A análise por GLC indica a composição monossacarídica de cada Carragenana, sendo útil para identificar derivados naturalmente metilados. Recentemente, Amicucci et al. (2019) desenvolveram um método abrangente para caracterizar a composição

monossacarídica utilizando um fluxo de trabalho de extração, derivatização e hidrólise em placa de 96 poços. Em seguida, é realizada análise por UHPLC/QqQ MS (cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa de quadripolo triplo) operado em modo de monitoramento de reação múltipla dinâmica (dMRM).

As Carragenanas também podem ser estudadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C a fim de descobrir informações estruturais como anomericidade da ligação glicosídica e padrão de substituição dos grupos substituintes na estrutura. Além disso, o espectro de HSQC relaciona a ligação entre os átomos de ^1H e ^{13}C (BEAUMONT et al., 2021). Normalmente a análise de RMN é realizada em temperatura elevada para reduzir a viscosidade da solução, podendo ser realizadas análises mono- e bidimensionais. (VAN DE VELDE et al., 2002). Geralmente, as amostras são solubilizadas em água deuterada (D_2O), congeladas e liofilizadas para remover a água (H_2O) residual e melhorar a qualidade do espectro. Além disso, é necessário utilizar uma solução como padrão interno para fazer a calibração, como a acetona, um meio tradicional de calibração dos polissacarídeos, que possui valores de $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ para ^{13}C .

Um exemplo de espectro de RMN ^1H de κ -Carragenana é mostrado na figura 3.

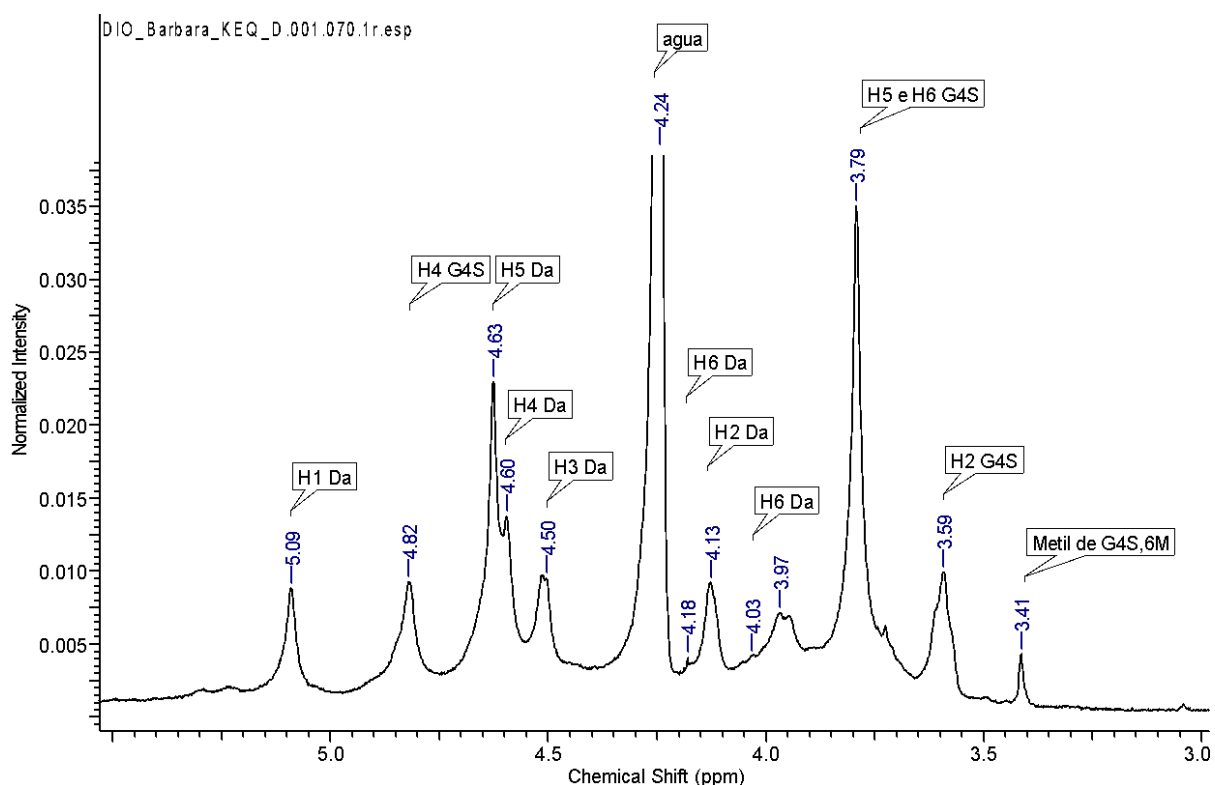


Figura 3: Espectro de ^1H de κ -Carragenana extraída da alga *Kappaphycus alvarezii* (Fonte: O Autor (2018)).

O sinal α -anomérico correspondente a unidade de 3,6-anidro- α -D-galactopirranose (DA) aparece em 5,09 ppm. Outros assinalamentos correspondentes a díade de κ -Carragenana são mostrados na figura. (SANTOS et al., 2015). A integração dos sinais α -anoméricos permite quantificar o teor de cada díade correspondente aos tipos de Carragenanas presentes no material analisado.

Na investigação da estrutura macromolecular de Carragenanas, a principal análise envolve a determinação da massa molecular ponderal média (Mw). A técnica utilizada é a cromatografia de exclusão de tamanho ou cromatografia de permeação em gel, (BEAUMONT et al., 2021). Além de ser utilizada para a determinação de massa molecular ponderal média, a cromatografia também auxilia na análise de homogeneidade da amostra. Estas técnicas são importantes para elucidar a estrutura das Carragenanas em diferentes aplicações biológicas (PATEL et al., 2012).

3. SISTEMA DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Para compreender a maneira que as Carragenanas atuam como agentes anticoagulantes, é necessário discorrer sobre o sistema de coagulação sanguínea. Este sistema não depende apenas de uma cascata de ativação de zimogênios à proteases mas depende de todas as etapas do sistema de coagulação de uma forma conjunta (ADAMS et al., 2009).

O sistema de coagulação é importante porque o organismo necessita de mecanismos que impeçam a perda de sangue, além de mecanismos que impeçam a formação de trombos, de forma a evitar indesejadas obstruções intravasculares, visando a hemostasia (RIEWALD et al., 2002). Assim, de uma maneira mais tradicional, o sistema de coagulação é dividido em duas etapas, a hemostasia primária e a secundária. Esta divisão é muito útil quando se pensa na didática do assunto. Dentro destas, ocorre uma ordem de processos objetivando a coagulação, mas que estão continuamente relacionadas. A hemostasia primária é o processo que envolve a ação celular na formação de um tampão estável no local lesionado. A fonte primária dessa etapa é as plaquetas (ONISHI et al., 2016), células sanguíneas que se agregam, auxiliando o processo de coagulação (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2021). Quando um vaso é lesionado, o colágeno presente na parede do vaso é exposto e, assim, as plaquetas são atraídas para este local. Justamente nesta região, há a liberação do Fator de Von-Willebrand (vWF), o qual faz uma ponte entre o colágeno e os receptores da superfície plaquetária promovendo sua adesão e agregação para ativar as plaquetas (PALTA et al., 2014). Tal ativação causa uma degranulação nas plaquetas e estas liberam alguns fatores importantes como adenosina difosfato (ADP), serotonina e tromboxano A₂ (TXA₂). A ação da serotonina causa um efeito constritivo, diminuindo o fluxo sanguíneo. A liberação de ADP com TXA₂, por sua vez, estimulam a agregação de mais plaquetas no local de lesão e, além disso, as plaquetas ativas expõem sítios de ligação para o fibrinogênio de plaquetas visando a formação do tampão através da agregação plaquetária.

Assim, o tampão plaquetário formado depois destes processos auxilia a reunir fatores de coagulação previamente ativados na hemostasia secundária, a qual envolve a cascata de coagulação (ONISHI et al., 2016).

A hemostasia secundária envolve reações bioquímicas que ativam zimogênios a proteases. Ao fim desta cascata, o fibrinogênio circulante é convertido a fibrina, uma proteína insolúvel, que auxilia na formação do coágulo (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2021). A cascata de coagulação é dividida entre via extrínseca e via intrínseca. A via intrínseca se dá de maneira espontânea, quando as superfícies de membrana são expostas de alguma forma e interagem com o sangue devido a alguma lesão (SANTOS et al., 2015). Com essa exposição, o fator de Hageman (fator XII) é ativado e, juntamente com a ativação do fator XI, a cascata é desencadeada (ONISHI et al., 2016). A via extrínseca tem este nome porque o fator que a desencadeia é o fator tecidual ou tromboplastina, uma glicoproteína transmembranar (PANT et al., 2018) que não está no sangue circulante, mas é expressa na camada endotelial dos vasos sanguíneos e é exposta quando há lesão tecidual (SANTOS et al., 2015). O fator tecidual, então, se liga ao fator VII, também culminando na cascata de coagulação. Essas duas vias se unem através do fator X na via comum, na qual ocorre a conversão, proteolítica, de fibrinogênio plasmático em fibrina insolúvel pelo fator IIa (trombina) e, por meio do fator XIII, as fibrinas são ligadas formando um processo de coágulo de fibrina. Esse processo é representado na figura 4 (PANT et al., 2018).

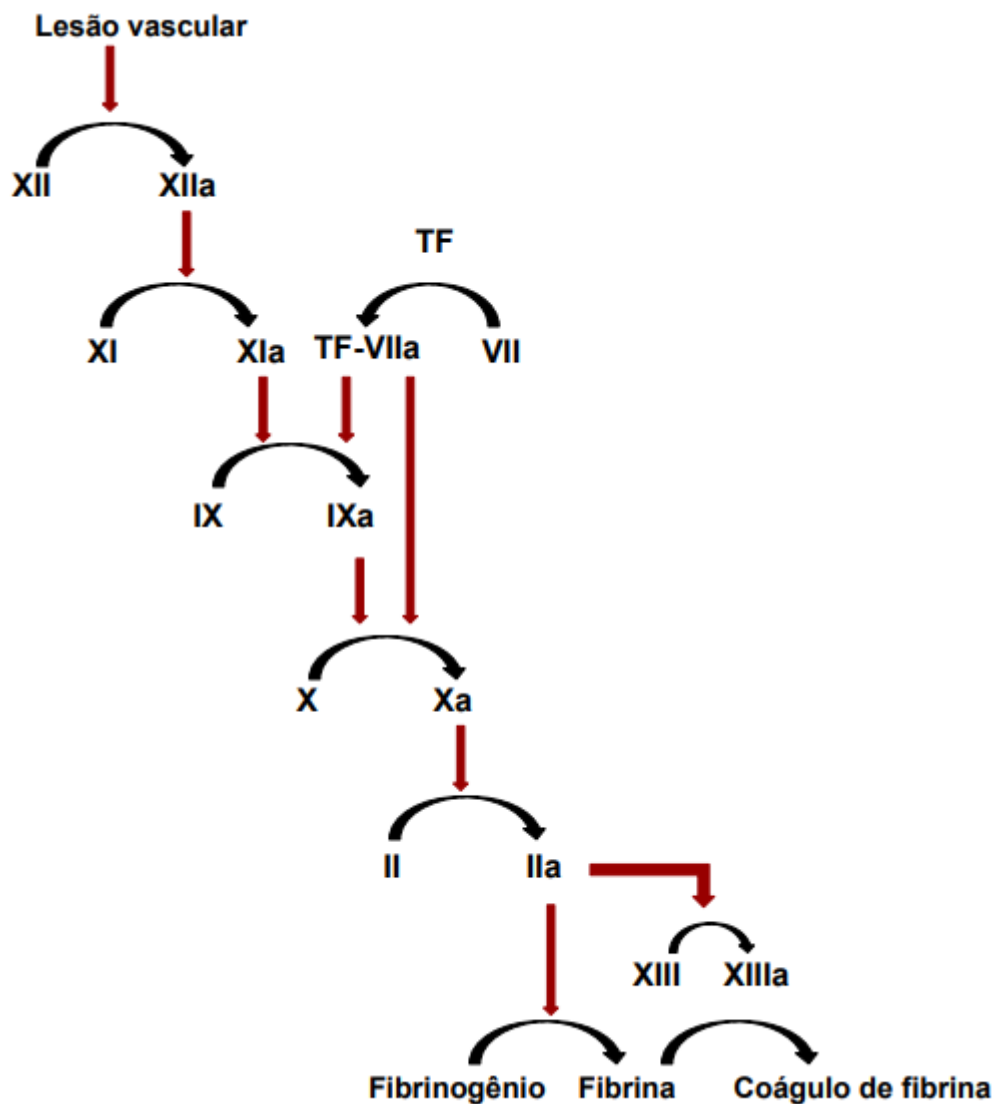


Figura 4: Esquema Clássico da Cascata de Coagulação (Fonte: O autor (2021), com base em ONISHI et al. (2014)).

Apesar de a coagulação ser sistematicamente dividida em etapas e processos, como foi mencionado acima, o sistema de coagulação ocorre com a colaboração conjunta dessas etapas. O que foi abordado até agora é válido porque esses procedimentos para formar um tampão celular e uma cascata de coagulação realmente ocorrem de maneira esquemática e são necessários. Porém, o entendimento da cascata de coagulação sofreu uma modificação para um modelo que abrange de uma forma mais intensa a interligação das vias extrínseca e intrínseca, além da simples ativação de zimogênios em cascata. Esse modelo

também abrange um melhor entendimento dos mecanismos de regulação da coagulação, da potência de fatores para alcançar a hemostasia regulada e de processos mediados por membranas (ADAMS et al., 2009).

Essa visão mais atual do sistema de coagulação é bem descrita por Adams et al. (2009), os quais demonstram que esse evento envolve o fator tecidual como um instigador protagonista da coagulação porque, além de se complexar com o fator VIIa, ativa os fatores X e IX e acentua a importância do fator IIa para a formação de um tampão estável. Aqui já é possível observar a ligação direta entre a hemostasia primária e secundária apresentadas anteriormente. Além disso, essa visão mais conjunta mostra a interdependência dos fatores de coagulação com os elementos celulares, na qual os componentes celulares fornecem uma superfície fosfolipídica com carga negativa onde os eventos envolvendo os fatores de coagulação podem ocorrer, de maneira localizada. Adams et al. (2009) descreveram algumas fases que demonstram de maneira clara a ligação entre as etapas do sistema de coagulação: fase de iniciação, amplificação e de propagação, que já haviam sido nomeadas por Pérez-Gómez et al. (2007). Na fase de iniciação ocorre a exposição dos fatores de coagulação (FC) e do fator tecidual (FT), expresso em diversos tecidos e células, como plaquetas, além de micropartículas circulantes (MP). O FT se complexa com o fator VII formando o complexo extrínseco tenase (CET). Pequenas quantidades de fatores IX e X são ativados, fazendo com que protrombinase seja formada, a qual converte a protrombina em sua forma proteolítica ativa, o fator IIa (BUNGAY et al., 2008). A fase seguinte é a de amplificação, que, literalmente, amplifica a formação de fator IIa, acelerando a agregação plaquetária (PÉREZ-GÓMEZ et al., 2007). Nesta fase, o fator IXa se complexa com seu cofator VIIIa, formando o complexo intrínseco tenase (CIT) em uma superfície de membrana, na presença de cálcio (Ca^{2+}). Além disso, a junção do fator Xa com o fator Va, forma o complexo protrombinase (CP). A formação destes complexos causa um grau de amplificação no processo de coagulação por aumentar os níveis de ativação do fator X, gerando uma produção acentuada de fator IIa (ADAMS et al., 2009). O fator IIa produzido interage com os receptores de plaqueta, fazendo com que plaquetas tenham

interações com outros componentes de membrana, como a proteína 1 ativada por proteases (PAR-1) (CANDIA et al., 2001). Essa proteína promove maior expressão de fator Va na membrana e receptores nas plaquetas. Ocorre uma degranulação alfa das plaquetas, melhorando a agregação plaquetária. Além disso, o fator IIa também aumenta a geração do fator VIIIa pela liberação do complexo do fator VIII com o fator de Von Willebrand. Os complexos são colocados para possibilitar a geração eficiente de grandes quantidades de fator IIa para a fase seguinte. A fase de propagação é a última e depende do recrutamento de plaquetas ativas para o sítio de lesão para gerar o fator IIa, CP, CIT e CET para formar um tampão estável (Adams et al., 2009). Dessa forma, ocorre uma “explosão” da formação de fator IIa para que se possa formar fibrina suficiente na formação do coágulo. Então, o fator XIII reticula covalentemente as cadeias de fibrina para uni-las numa rede. Por sua vez, o fator IIa também ativa o TAFI (Inibidor de Fibrinólise Ativável pela Trombina - fator IIa) (HOFFMAN et al., 2006), para proteger o coágulo, impedindo que a fibrina seja degradada (Figura 5).

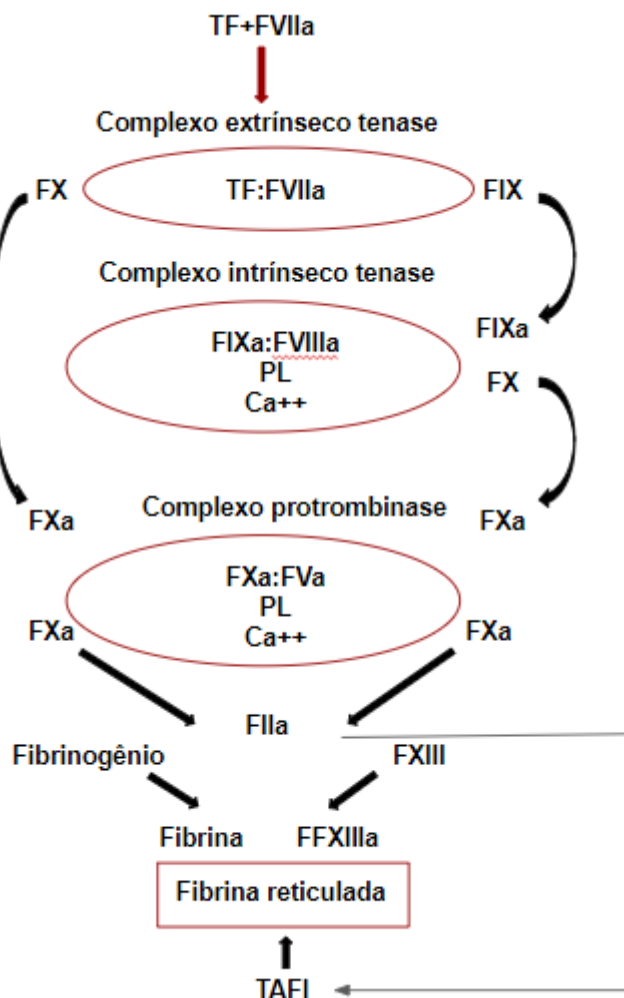


Figura 5: Esquema Moderno da Cascata de Coagulação (Fonte: O autor (2021), com base em ADAMS et al. (2009)).

Para manter a hemostasia do organismo, além de mecanismos para evitar o extravasamento de sangue, são necessários mecanismos para regular o sistema de coagulação a fim de evitar a formação de trombos. Para isto, há regulações naturais no organismo que atuam em diferentes fases do sistema de coagulação, por vias enzimáticas, por inibição ou modulação da atividade de algum cofator (ADAMS et al., 2009). Um exemplo desta regulação natural é o Inibidor da via da formação de tecidos (TFPI), que é uma proteína produzida no endotélio e age neutralizando a ativação catalítica do fator X e inibindo o complexo extrínseco tenase (DAHLBACK et al., 2005). A antitrombina (AT) também é um regulador do sistema de coagulação por ser um inibidor de serina protease e age preferencialmente em enzimas livres

envolvidas com CIT, CET e CP. Assim, a AT limita a coagulação ao local lesionado e não permite uma extensão patológica (PIKE et al., 2005).

Porém, em situações em que estes mecanismos naturais não são suficientes, entra a ação anticoagulante de moléculas exógenas para prevenir a formação de trombos por coagulação exacerbada (FRANSSON et al., 2013). Estas moléculas podem ser de diferentes fontes e estruturas. Entretanto, sua característica comum é interferir no sistema de coagulação sanguínea. Uma molécula anticoagulante de referência na clínica é a Heparina, um polissacarídeo do grupo dos glicosaminoglicanos altamente sulfatado e negativamente carregado. Esta molécula age como anticoagulante, aumentando a afinidade da proteína inibitória AT pelo fator Xa e pelo fator IIa, facilitando a inativação destes elementos-chaves da cascata de coagulação, interferindo no sistema de coagulação (HIRSH et al., 2001). Apesar de a Heparina não possuir uma forte ligação com o fator IIa devido a sua alta carga negativa, ATIII se liga à estrutura polissacarídica da Heparina por uma sequência pentassacarídica, necessária para induzir uma mudança conformacional do complexo terciário e fazê-la agir como anticoagulante (LINDAHL et al., 1983). Quando a Heparina se liga ao inibidor de serina protease ATIII, esta sofre uma alteração conformacional que resulta na inibição do fator IIa e de outras proteases da cascata de coagulação através de um complexo terciário (SANTOS et al., 2015). Dessa forma, a cadeia de Heparina, AT e fator IIa formam um complexo terciário, inibindo a conversão de fibrinogênio solúvel em um coágulo de fibrina insolúvel. Além da Heparina, os antagonistas de vitamina K agem inibindo os fatores dependentes da vitamina K da cascata, como a Varfarina, e há ainda os novos anticoagulantes orais sem vitamina K, que partem das limitações dos antagonistas. Estes agem visando componentes específicos da cascata de coagulação, como o fator IIa ou fator Xa, trazendo uma ação mais protetiva que a Varfarina, por exemplo (ENRIQUEZ et al., 2016).

4. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA DAS CARRAGENANAS

Um dos registros mais antigos que se tem sobre a atividade anticoagulante das Carragenanas é de Hawkins et al. (1963), que se utilizaram do isolamento de κ e λ -Carragenana realizado por Smith, D. B; Cook, W. H. (1953) da alga *Chondrus crispus*. Usando testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de trombina (TT), os autores demonstraram que essas Carragenanas eram menos potentes que a Heparina mas se assemelhavam a ela inibindo o estágio terminal da coagulação, ou seja, a transformação do fibrinogênio em fibrina, responsável pela consolidação do coágulo. Sugeriu-se, desde então, que as Carragenanas possuem uma potencial atividade anticoagulante que poderia ser investigada posteriormente. Além disso, Hawkins et al. (1963) observaram que a λ -Carragenana foi mais ativa que a κ -Carragenana tanto no teste de TP quanto no de TT, mostrando que as diferenças estruturais destas Carragenanas poderiam ter alguma influência na sua atividade.

A partir dos anos 2000, muitos outros relatos são encontrados na literatura sobre o potencial anticoagulante das Carragenanas. A atividade de ι e κ -Carragenana, ambas com a unidade β 4-sulfatada, é descrita em trabalhos como o de Silva et al. (2010). Neste estudo foi testada a atividade anticoagulante dos três principais tipos de Carragenanas, extraídas da alga vermelha *Hypnea musciformis*, usando testes de tempo de tromboplastina parcial (aPTT) e TP, com plasma humano doado. Foi observado que as Carragenanas possuem uma atividade anticoagulante mediante a inibição do fator IIa. Além disso, segundo Silva et al. (2010), ι - e κ -Carragenana apresentaram um resultado de aPTT de 132 e 240 segundos, respectivamente, enquanto λ -Carragenana foi a que mostrou maior atividade anticoagulante com um tempo de 240 segundos em uma concentração cinco vezes menor. Assim, foi observado que ι -Carragenana apresentou a menor atividade anticoagulante em sua forma nativa, seguida pela κ -Carragenana. Os autores atribuíram a maior atividade de λ -Carragenana ao maior teor de grupamentos sulfatos existentes na estrutura desta Carragenana. Além disso, os melhores resultados na diminuição do tempo de aPTT indicaram que as Carragenanas agem especificamente pela via intrínseca. Este foi um avanço

importante para conhecer o mecanismo de ação das Carragenanas, considerando a vasta possibilidade de atuação dos anticoagulantes em todo o sistema de coagulação. Araújo et al. (2012) observaram que ι-Carragenana não modificou o tempo em aPTT, o que mostra que esse polissacarídeo não afetou significativamente a cascata de coagulação pela via intrínseca. Rodrigues et al. (2010) investigaram a atividade anticoagulante de ι-Carragenana extraída da alga *Solieria filiformis* mediante dois métodos de extração: com papaína bruta em tampão acetato de sódio com cisteína 5mM e EDTA (M1) ou com água quente (M2). Houve um maior rendimento na fração obtida por M1, além de ser a única das duas frações a apresentar atividade anticoagulante por aPTT, ainda que de maneira muito inferior à Heparina. Foi possível observar neste estudo que a ι-Carragenana atua pela via intrínseca da cascata de coagulação, uma vez que não apresentou atividade em testes como TP. De maneira semelhante, Rodrigues et al. (2011) avaliaram por aPTT a atividade anticoagulante de κ-Carragenana extraída da alga vermelha *Hypnea musciformis* por dois métodos diferentes de extração. A principal diferença entre os métodos é que em um deles a κ-Carragenana foi isolada por meio de uma digestão proteolítica com a papaína (M1) e no outro método foi mediante extração com água quente seguida de cromatografia de troca iônica (M2). Os resultados mostraram que o a fração de κ-Carragenana obtida por M1 apresentou um menor teor de sulfato e de conteúdo de carboidratos totais que por M2. Foi observado pelas análises por aPTT que a atividade anticoagulante da κ-Carragenana extraída por M1 foi maior, considerando que o tempo do aPTT foi prolongado. Os autores apontam a importância do tipo de extração utilizada porque as características físico-químicas e a biossíntese destes polissacarídeos podem ser afetadas pelos fatores ambientais (RODRIGUES et al., 2011). Foi possível observar neste estudo que a atividade anticoagulante melhorou com a fração que apresentou menor teor de sulfato. Se a melhora da atividade anticoagulante for atribuída à redução do teor de sulfato, entra-se em desacordo com o que disse Silva et al. (2010) e esta afirmação deve ser repensada. Porém, há a possibilidade de a atividade anticoagulante ter sido alterada a partir de uma possível mudança no peso

molecular das κ -Carragenanas obtidas por cada método de extração e esta caracterização não foi feita no trabalho mencionado. Araújo et al. (2013) mostraram que, além de a presença dos grupamentos sulfato beneficiarem a atividade anticoagulante em Carragenanas, a posição em que estão inseridos tem também grande influência. Estas afirmações foram identificadas através da sulfatação seletiva de Carragenanas e análises por aPTT para correlacionar a regioquímica dos grupos sulfato com a atividade anticoagulante. A partir dos resultados obtidos, foi observada que a sulfatação em C2 de 3,6-anidro- α -D-Galp e C6 de β -D-Galp tem efeito benéfico na atividade anticoagulante por aPTT. Liang et al. (2014) vincularam os efeitos estruturais de Carragenanas à atividade anticoagulante, confirmando o que foi sugerido por Araújo et al. (2013) que a posição de substituição dos grupos sulfato mostra o maior impacto na atividade anticoagulante. Além disso, os testes de aPTT e PT realizados indicaram uma ordem de importância da região sulfatada para o um melhor desempenho na atividade anticoagulante. Esta sequência nas Carragenanas segue G-6 > A-2 > G-2, sendo "G" referente à unidade β -D-Galp e "A" à 3,6-anidro- α -D-Galp. Fatores como a concentração das Carragenanas também influencia na atividade anticoagulante como foi apontado por Sanjivkumar et al. (2020).

λ -Carragenana possui a unidade β 2-sulfatada e é descrita como a Carragenana de maior atividade anticoagulante, como já foi observado pelos estudos de Silva et al. (2010) em comparação com a ι - e κ -Carragenana. Solokova et al. (2014) registraram uma atividade antitrombótica conservada em λ -Carragenana, diferente do que ocorre com a Heparina. Segundo os autores tal fato foi constatado a partir de resultados obtidos pela agregação plaquetária no plasma em experimentos *in vitro* de aPTT. É importante citar que a atividade anticoagulante é diferente da atividade antitrombótica. Se a atividade anticoagulante tem a finalidade de interferir na cascata de coagulação, a atividade antitrombótica tem a função de impedir a formação de trombos através de uma menor agregação plaquetária (SOLOKOVA et al., 2013). A ação antitrombótica está intimamente vinculada com a ação anticoagulante nas Carragenanas. Guan et al. (2017) citam a

maior atividade antitrombótica de λ -Carragenana comparado à κ -Carragenana devido ao maior teor de sulfato em λ -Carragenana, da mesma forma que ocorre na atividade anticoagulante. Sabendo que λ -Carragenana possui a maior atividade anticoagulante e antitrombótica dentre as Carragenanas e que essa atividade ocorre pela via intrínseca da cascata de coagulação, Groult et al. (2019) avaliaram a atividade anticoagulante de derivados de λ -Carragenana obtidos por degradação com H_2O_2 . As propriedades anticoagulantes dos derivados de λ -Carragenana preparados neste estudo foram avaliadas por meio da inibição da atividade dos Fatores Xa e IIa promovida por AT, ou seja, um processo muito similar ao da Heparina. Foi observado que a maioria dos oligossacarídeos (λ -Cos) inibiu os fatores Xa e IIa por meio de sua interação com AT. Os autores sugerem que esse resultado pode ter acontecido por causa de uma maior liberdade estérica obtida com o início da despolimerização da λ -Carragenana nativa, permitindo uma melhor acessibilidade à provável sequência de ligação entre a Carragenana e a AT. A partir de certo ponto da despolimerização, houve uma diminuição na atividade anti-Xa que estava claramente relacionada à dessulfatação não intencional consequente da modificação química das moléculas de λ -carragenana e não com a síntese de oligossacarídeos menores, sugerindo que substituições chave de sulfato estão incluídos na sequência de ligação potencial de λ -Carragenana a AT. Entretanto, o menor λ -Cos foi identificado como um inibidor direto do fator IIa, mesmo dessulfatado. Assim, pode-se avaliar, a partir deste estudo, a alta atividade anticoagulante de derivados de λ -Carragenana, que ocorre, provavelmente, por mecanismos muito próximos ao da Heparina, como a interação com os fatores Xa e IIa, por interação direta ou através da antitrombina. Apesar de Groult et al. (2019) mostrarem que a despolimerização foi sinérgica à atividade anticoagulante, Saluri et al. (2020) demonstraram, a partir da síntese de λ -Carragenanas de diferentes pesos moleculares, que a atividade anticoagulante de λ -Carragenana diminuiu com diminuição do peso molecular.

A alga *Botryocladia occidentalis* é capaz de produzir Carragenanas (GBO). A estrutura destas Carragenanas é conhecida e definida por repetições de

α -D-galactose 2,3-dissulfatada ou 2-sulfatada ligada a unidades β -D-galactose 2-sulfatada (SAMPAIO et al., 2020). Essas características estruturais de GBO permite sua classificação no grupo das Carragenanas, pertencentes à família das λ -Carragenanas, devido a sulfatação em C2 da unidade β . Farias et al. (2000) observaram que a atividade anticoagulante de GBO se dá por inibição dos fatores IIa e Xa pela AT. Além disso, a ação anticoagulante de GBO foi 15 vezes maior quando comparada à atividade da agarana 2-O-sulfatada extraída de *Echinometra lucunter*, apesar da densidade de carga dos polissacarídeos serem semelhantes. Segundo os autores, essa atividade mais alta em GBO pode ocorrer pela presença de galactose 2,3-sulfatada, uma vez que esse tipo de unidade é ausente na agarana. Melo et al. (2004) indicaram que a base de interação entre GBO com os diversos fatores do sistema de coagulação é complexa e depende da distribuição dos grupos sulfato e da composição dos monossacarídeos. Assim, este estudo mostrou que a atividade anticoagulante se deve a fatores como densidade de carga do polissacarídeo, composição monossacarídica, sítios de sulfatação e presença de unidades dissulfatadas. Sampaio et al. (2020) mostraram que GBO possuem uma atividade anticoagulante e antitrombótica dependente da dosagem. Ou seja, GBO atingiram atividade anticoagulante notável em até 130 unidades internacionais [IU]/mg em diferentes testes (aPTT, TT E TP). Porém, em doses muito aumentadas, houve a formação de trombos. Sampaio et al. (2020) ainda relataram que GBO possui uma atividade anticoagulante independente de serpina, ligando-se aos fatores IIa e Xa na ausência de AT em experimentos *in vitro*, ao contrário do que acontece com a Heparina. O mecanismo independente de serpina ocorre por uma inativação direta de componentes do complexo da protrombinase, como fator Va, fator Xa e fator II, e do complexo de tenase intrínseca, como fator VIIIa, fator IXa e fator X, mostrando a ligação entre atividade anticoagulante e as características físico-químicas das GBO.

É possível observar que a atividade anticoagulante das Carragenanas depende de diversos fatores, desde a alga de origem, método de extração, estrutura química do polímero. Ainda há maneiras de aprimorar essa atividade anticoagulante

utilizando modificações químicas que alterem a estrutura dos polissacarídeos. Santos et al. (2019) e Araújo et al. (2013) realizaram a oxidação de C6 e a sulfatação seletiva de Carragenanas, respectivamente. Através destes trabalhos é possível analisar o efeito da modificação estruturais na atividade anticoagulante das Carragenanas. Santos et al. (2019) oxidaram Carragenanas de diferentes padrões de sulfatação e testaram suas atividades anticoagulantes através de ensaio de aPTT. Em relação as Carragenanas nativas, foi observado que a λ -Carragenana foi a fração mais potente, seguida por θ -Carragenana, ι -Carragenana e κ -Carragenana. Com a reação de oxidação seletiva de C6 das unidades β , houve um aumento da atividade anticoagulante de algumas Carragenanas, incluindo κ e λ -Carragenana e uma diminuição da atividade de ι -Carragenana. Foi ainda observado que a atividade anticoagulante de κ -Carragenana parcialmente oxidada foi maior que a amostra totalmente oxidada, sugerindo que oxidação completa das unidades β -D-Galp não causou um efeito biológico mais intenso e que o grupamento carboxila não é a principal característica que explica a maior atividade dos derivados oxidados. Araújo et al. (2013) sulfataram regiosseletivamente as Carragenanas naturalmente sulfatadas e testaram a atividade anticoagulante por meio de aPTT, encontrando uma maior atividade anticoagulante nas frações modificadas. Foi observado um efeito benéfico na atividade anticoagulante com o aumento de DS. Porém, esse aumento de atividade não ocorreu de maneira crescente e por isso os autores sugeriram que não apenas a densidade de sulfato é importante na estrutura das Carragenanas para uma melhor atividade anticoagulante, mas também a posição dos grupos sulfatos. Ambos trabalhos mostram que as modificações químicas alteram a atividade anticoagulante das Carragenanas. Ou seja, há um efeito sinérgico dos grupos carboxila com a atividade anticoagulante em algumas Carragenanas, bem como a sulfatação aumenta esta atividade, de acordo com a regiosseletividade dos grupamentos sulfatos inseridos. Pode-se observar também, pelos estudos de Groult et al. (2019), a possibilidade de aprimorar a atividade anticoagulante de Carragenanas através da síntese de polissacarídeos com tamanho de cadeia menor, como oligossacarídeos. Assim, a modificação química

pode ser uma alternativa para melhorar a atividade anticoagulante das Carragenanas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do exposto é observado que as Carragenanas são objeto de estudo há bastante tempo e suas aplicações ainda são muito investigadas. Há uma diversidade estrutural nas Carragenanas, relacionada principalmente ao padrão de sulfatação, que contribui para suas características físico-químicas e bioativas. Além disso, a determinação da estrutura química das Carragenanas por métodos analíticos é uma etapa essencial no seu estudo. Dentre as aplicações biológicas das Carragenanas, o estudo da atividade anticoagulante tem destaque na literatura devido à sua potencial aplicação na clínica, como em casos de doenças cardiovasculares, e aos potenciais riscos causados a longo prazo por anticoagulantes como a Heparina. A atividade anticoagulante destes polissacarídeos varia em cada família de Carragenana, sendo a λ -Carragenana a mais bioativa com um mecanismo próximo ao da Heparina. Esse mecanismo envolve principalmente a inibição do fator IIa e Xa através de AT e é repetido por GBO, que possuem uma estrutura próxima a da λ -Carragenana com a unidade β 2-sulfatada, porém, com a unidade α 2,3-dissulfatada, e são promissores agentes anticoagulantes, agindo através de um mecanismo dependente ou independente de serpina. Modificações químicas como a oxidação, sulfatação e produção de oligossacarídeos podem aprimorar a atividade anticoagulante de Carragenanas, segundo experimentos *in vitro*. Há ainda diversos pontos para serem investigados, por exemplo, elucidar interferência das Carragenanas nos complexos tenase e de protrombina como um mecanismo mais moderno da ação anticoagulante destes polissacarídeos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.; BIRD, R. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, v. 14, n. 5, p. 462–470, 2009.

AHMED A.; ADEL, M.; KARIMI, P.; PEIDAYESH, M. Pharmaceutical, Cosmeceutical, and Traditional Applications of Marine Carbohydrates. **Chapter Ten**, v. 73, p. 197-220, 2014.

ALBAN, S. Adverse Effects of Heparin. **Heparin - A Century of Progress**. Kiel, v. 207, p. 211-263, 2011.

AMICUCCI, M. L.; GALERMO, A. G.; NANDITA, E.; VO, T. T.; LIU, Y.; LEE, M.; XU, G.; LEBRILLA, C. B. A rapid-throughput adaptable method for determining the monosaccharide composition of polysaccharides. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 438, p. 22-28, 2019.

ARAÚJO, C.; NOSEDA, M.; CIPRIANI, T.; GONÇALVES, A.; DUARTE M.; DUCATTI, D. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483-491, 2013.

ARAÚJO, I. W. F. D.; RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. D. S. O.; PAULA, G. A. D.; LIMA, T. D. B.; BENEVIDES, N. M. B. *Iota-carrageenans* from *Solieria filiformis* (Rhodophyta) and their effects in the inflammation and coagulation. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 2, p. 127-135, 2012.

BARTOSIKOVA, J. N. L. Carrageenan: a review. **Veterinari Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187-205, 2013.

BEAUMONT, M.; TRAN, R.; VERA, G.; NIEDRIST, D.; ROUSSET, A.; PIERRE, R.; SHASTRI, V. P.; FORGET, A. Hydrogel-Forming Algae Polysaccharides: From Seaweed to Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 22, p. 1027-1052, 2021.

BICO, S. L. S.; RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, R. M. S. C.; MORAIS, A. M. M. B. Combined effects of chemical dip and/or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh-cut banana. **Food Control**, v. 20, p. 508–514, 2009.

BUNGAY, S. D. Modelling the effect of amplification pathway factors on thrombin generation: A comparison of hemophilias. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 38, p. 41-47, 2008.

CAMPO, V.; KAWANO, D.; JUNIOR, D.; CARVALHO I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.

CÁCERES, P. J.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E. A. Carrageenans from chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, v. 53, p. 81-86, 2000.

CANDIA, E. D.; HALL, S. W.; RUTELLA, S.; LANDOLFI, R.; ANDREWS, R. K.; CRISTOFARO, R. D. Binding of Thrombin to Glycoprotein Ib Accelerates the Hydrolysis of Par-1 on Intact Platelets. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4692-4698, 2001.

CHANG, A.; TU, C.; CHEN, Y. NAN, F.; CHEN, J. The immunostimulatory effects of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 197-205, 2007.

CUMASHI, A.; USHAKOVA, N. A.; PREOBRAZHENSKAYA, M. E.; D'INCECCO, A.; PICCOLI, A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G. E.; BERMAN, A. E.; BILAN, M. I.; USOV, A. I.; USTYUZHANINA, N. E.; GRACHEV, A. A.; SANDERSON, C. J.; KELLY, M.; RABINOVICH, G. A.; IACOBELLI, S.; NIFANTIEV, G. E. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541-552, 2007.

CUNHA, M. J. S.; PINTO, C. A. V.; GUERRA, J. C. C.; TACHIBANA, A.; PORTIGAL, M. F. C.; FERRAZ, L. J. R.; WOLOSKER, N. Incidence, diagnosis, treatment methods, and outcomes of clinically suspected venous thromboembolic disease in patients with COVID-19 in a quaternary hospital in Brazil. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 20, p. 1-7, 2021.

DALHBACK, B. Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 257, p. 209-223, 2005.

ENRIQUEZ, A.; LIP, G. Y. H.; BARANCHUK, A. Anticoagulation reversal in the era of the non-vitamin K oral anticoagulants. **e European Society of Cardiology**, v. 18, p. 955-964, 2016.

FARIAS, W.; VALENTE, A.; PEREIRA, M.; MOURÃO, P. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299–29307, 2000.

FRANSSON, F.; KYRK, T.; SKAGERLIND, M.; STEGMAYR, B. Rinsing the extra corporeal circuit with a heparin and albumin solution reduces the need for systemic anticoagulant in hemodialysis. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 36, p. 725-729, 2013.

FU, M.; WU, Y.; XUE, Z.; GENG, C.; XIA, Y. Study on the flame retardant property and the pyrolysis process of a novel potassium-ferric carrageenan fiber. **Materials Letters**, v. 281, p. 128652-128656, 2020.

GROULT, H.; COUSIN, R.; PLASSOT, C.; MAURA, M.; BRIDIAU, N.; PIOT, J.; MAUGARD, T.; ARNAUDIN, I. λ -Carrageenan Oligosaccharides of Distinct Anti-Heparanase and Anticoagulant Activities Inhibit MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration. **Marine Drugs**, v. 17, n. 3, p. 140-155, 2019.

GUAN, J.; LI, L.; MAO, S. Applications of Carrageenan in Advanced Drug Delivery. **Seaweed Polysaccharides**, p. 283-303, 2017.

HAWKINS, W. W.; LEONARD, V. G. The Antithrombotic Activity of Carrageenin in Human Blood. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 41, p. 1325-1327, 1963.

HIRSH, J.; ANAND S. S.; HALPERIN, J. L.; FUSTER, V. Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. **Circulation**, v. 103, p. 2994-3018, 2001.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 21, p. 1-11, 2007.

HU, X.; JIANG, X.; AUBREE, E.; BOULENGUER, P.; CRITCHLEY, A. T. Preparation and In Vivo Antitumor Activity of j-Carrageenan Oligosaccharides. **Informa Healthcare**, v. 44, n. 9, p. 646-650, 2006.

JANARTHANAN, M.; KUMAR, M. SENTHIL. The properties of bioactive substances obtained from seaweeds and their applications in textile industries. **Journal of Industrial Textiles**, v. 0, p. 1-41, 2017.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins Patologia Básica. In: LDTA, E. G. K. (10ª edição). **Grupo Editorial Nacional**. Rio de Janeiro: GEN, 2021. p. 96-119.

KUMAR, Y.; TARAFDAR A.; BADGUJAR, P. C. Seaweed as a Source of Natural Antioxidants: Therapeutic Activity and Food Applications. **Journal of Food Quality**, v. 2021, p. 1-17, 2021.

LIANG, W.; XUAN, M.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 776-785, 2014.

LINDAHL, U.; BACKSTROM.; THUNBERG, L. The Antithrombin-binding Sequence in Heparin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 9826-9830, 1983.

LIU, J.; ZHAN, X.; WAN, J.; WANG, Y.; WANG, C. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features *versus* adverse biological effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 27-36, 2015.

LIU, F.; HOU, P.; ZHANG, H.; TANG, Q.; XUE, C.; LI, R. Food-grade carrageenans and their implications in health and disease. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, p. 3918-3936, 2021.

MCKIM, J. M. Food additive carrageenan: Part I: A critical review of carrageenan in vitro studies, potential pitfalls, and implications for human health and safety. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 211-243, 2014.

MELO, F.; PEREIRA, M.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20824–20835, 2004.

MORI, T. Seaweed Polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 8, p. 315-350, 1953.

MOURÃO, P. A. S. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drugs. **Marine drugs**, v. 13, p. 2770-2784, 2015.

ONISHI, A.; ANGE, K.; DORDICK, J.; LINHARDT, R. Heparin and anticoagulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 21, p. 1372-1392, 2016.

PALVA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 58, n. 5, p. 515-523, 2014.

PANT, A.; KOPEC, A. K.; LUYENDYK, J. P. Role of the blood coagulation cascade in hepatic fibrosis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 315, n. 2, p. 171-176, 2021.

PATEL, S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. **3 Biotech**, v. 2, p. 171–185, 2012.

PEREIRA, M.; BENEVIDES, N.; MELO, M.; VALENTE, A.; MELO, F.; MOURÃO, P. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga,

Gelidium crinale. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.

PÉREZ-GÓMES, F.; BOVER, R. The New Coagulation Cascade and Its Possible Influence on the Delicate Balance Between Thrombosis and Hemorrhage. **Rev. Esp. Cardiol**, v. 12, p. 1217-1219, 2007.

PIKE, R. N.; BUCKLE, A. M.; BONNIEC, B. F.; CHURCH, F. C. Control of the coagulation system by serpins Getting by with a little help from glycosaminoglycans. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 4842-4851, 2005.

PIMENTEL, F. B.; ALVES, R. C.; RODRIGUES, F.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Macroalgae-Derived Ingredients for Cosmetic Industry-An Update. **Cosmetics**, v. 5, n. 2, p. 1-18, 2018.

QUITO, E.; CARO, R.; VEIGA, M. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 583-622, 2020.

RODRIGUES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2123-2134, 2005.

RODRIGUES, J.; ARAÚJO, I.; LIMA T.; BESSA, E.; BENEVIDES, N. Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2011.

RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F. D.; PAULA, G. A. D.; BESSA, E. F.; LIMA, T. D. B.; BENEVIDES, N. M. B. Isolamento, fracionamento e atividade

anticoagulante de *iota*-Carragenanas da *Solieria filiformis*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2310-2316, 2010.

RIEWALD, M.; RUF, W. Science review: Role of coagulation protease cascades in sepsis. **Critical Care**, v. 7, n. 2, p. 123-130, 2003.

RUNNING, C. A.; FALSHAW, R.; JANASWAMY, S. Trivalent iron induced gelation in lambda-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2735-2739, 2012.

SAMPAIO, T. B. P.; COSTA, B. B.; MOREIRA, T. A.; CABRAL, L. M.; SILVA, L. C. R. P.; MOURÃO, P. A. S.; VILANOVA, E.; CINELLI, L. P. Insights on chemical-biological correlations learned from investigations on the sulfated galactan from the marine alga *Bothryocladia occidentalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 471-476, 2020.

SANTOS, G. C. D. **Oxidação Seletiva de Carragenanas Utilizando o Reagente Tempo e o Ácido Tricloroisocianúrico como Co-oxidante**. 2015. 137 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR) 2015.

SANTOS-FIDENCIO, C.; GONÇALVES, A.; NOSEDA, M.; DUARTE, M.; DUCATTI, D. Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, p. 286-293, 2019.

SANJIVKUMAR, M.; CHANDRAN, M. N.; SUGANYA, A. M.; IMMANUEL, G. Investigation on bio-properties and in-vivo antioxidant potential of carrageenans against alloxan induced oxidative stress in Wistar albino rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 650-662, 2020.

S.F-TISCHER, P. C. D.; TALARICO, L. B.; NOSEDA, M. D.; GUIMARÃES, S. M. P.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 459-465, 2006.

SILVA, F.; DORE, C.; MARQUES, C.; NASCIMENTO, M.; BENEVIDES, N.; ROCHA, H.; CHAVANTE, S.; LEITE, E. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26-33, 2010.

SMITH, D. B.; COOK, W. H. Fractionation of carrageenin. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 45, p. 232–233, 1953.

SOLOKOVA, E. V.; BARABANOVA, A. O.; HOMENKO, V. A.; SOLOV'eva, T. F.; BOGDANOVICH, R. N.; YERMAK, I. M. *In Vitro* and *Ex Vivo* Studies of Antioxidant Activity of Carrageenans, Sulfated Polysaccharides from Red Algae. **Biophysics and Biochemistry**, v. 150, n. 4, p. 426-428, 2011.

SOLOKOVA, E.; BYANKINA, A.; KALITNIK, A.; KIM, Y.; BOGDANOVICH, L.; SOLOV'eva, T.; YERMAK, I. Influence of red algal sulfated polysaccharides on blood coagulation and platelets activation in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 102, n. 4, p. 1431-1438, 2014.

STORZ, C. A. Carrageenans: Structural and Conformational Studies. **Handbook of Carbohydrate Engineering**, p. 212-245, 2005.

USOV, A. Polysaccharides Of The Red Algae. **Advances In Carbohydrate Chemistry And Biochemistry**, v. 65, p. 115-217, 2011.

VELDE, F. V. D. Structure and function of hybrid carrageenans. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 727-734, 2008.

VELDE, F. V. D.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; 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.

WEINER, M. L. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies. **Informa healthcare**, v. 44, n. 3, p. 244-269, 2014.

WEINER, M. L.; NUBER, D.; BLACKMORE, W. R.; HARRIMAN, J. F.; COHEN, S. M. A 90-day dietary study on kappa carrageenan with emphasis on the gastrointestinal tract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 98-106, 2007.

ZHU, B.; NI, F.; SUN, Y.; ZHU, X.; YIN, H.; YAO, Z.; DU, Y. Insight into carrageenases: major review of sources, category, property, purification method, structure, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, p. 1261-1276, 2018.

ZIA, K.; TABASUM, S.; NASIF, M.; SULTAN, N.; ASLAM, N.; NOREEN, A.; ZUBER, M. A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. **Biological Macromolecules**, v. 96, p. 282-301, 2016.

ZÚÑIGA, E. A.; MATSUHIRO, B.; MAJÍAS, E. Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 208-215, 2006.