



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MARIA CLARA SANTOS DE SANTANA NOGUEIRA

**LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO
NANOSISTEMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS PARA MACRÓFAGOS ALVEOLARES**

Vitória de Santo Antão

2015

MARIA CLARA SANTOS DE SANTANA NOGUEIRA

**LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO
NANOSISTEMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS PARA MACRÓFAGOS ALVEOLARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, sob orientação da Professora Dr^a Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira.

Vitória de Santo Antão

2015

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB-4: 2018

N778I Nogueira, Maria Clara Santos de Santana
Lipossomas revestidos com polissacarídeo sulfatado como nanosistemas
sítio-específicos para macrófagos alveolares / Maria Clara Santos de Santana
Nogueira. – Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.
43 folhas.

Orientadora: Mariane Cajubá de Brito Lira Nogueira
TCC (Bacharelado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco,
CAV. Curso de Nutrição, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. Lipossomas. 3. Macrófagos. 4. Farmacologia. I.
Nogueira, Mariane Cajubá de Brito Lira (Orientadora). II. Título.

620.5 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-021/2016

Folha de aprovação

Nome da aluna: Maria Clara Santos de Santana Nogueira

Título: LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM POLISSACARÍDEO SULFATADO COMO NANOSISTEMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS PARA MACRÓFAGOS ALVEOLARES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Data:

Nota:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira CAV-UFPE

Dr. Francisco Humberto Xavier Junior – UFPE

Mcs. Larissa Chaves Costa - UFPE

A minha família e a todos que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por todas as oportunidades e por me carregar nos braços nos momentos mais difíceis dessa caminhada. E a Imaculada mãe de Deus, Maria, por toda proteção nessa trajetória;

A minha família por toda dedicação, amor, compreensão, ensinamento e apoio que me foi dado durante toda graduação. Por todos os puxões de orelha e por acreditar que eu seria capaz de vencer mais essa. Muito Obrigada, amo vocês!

Ao meu marido, Leandro, pelo amor e dedicação e por sempre fazer tudo para me ajudar. Amo você;

Aos meus sogros que vivenciaram de perto cada conquista comigo e me apoiaram sempre;

Aos meus amigos por entenderem as vezes que precisei me ausentar e por me apoiarem em cada escolha minha. Não poderia escolhido pessoas melhores para estar ao meu lado;

À Prof^aDr^a Mariane Lira pela orientação, carinho e compreensão. Obrigada por ter acreditado em mim, por me acompanhar desde o meu primeiro período da graduação, pelas orientações na monitoria e na iniciação científica. Obrigada por tantos conselhos e ensinamentos acadêmicos e pessoais, pela amizade e por todas as vezes que me direcionou ao melhor caminho;

Aos professores e aos funcionários do CAV-UFPE por toda dedicação e ensinamento transmitido durante esse período;

Aos meus colegas de sala e da universidade, levarei sempre comigo todos os momentos que vivemos juntos, nossas aflições e a felicidade de cada um pela conquista do outro. Vocês foram muito importantes;

Ao Laboratório NanoBioCel e ao LIKA pela disponibilidade da infraestrutura e suporte dado a este trabalho;

A todos os colegas e amigos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Se você pode sonhar, você pode fazer”.

(Walt Disney)

RESUMO

O revestimento de nanossistemas com polissacarídeos, especificamente os sulfatados como a fucana, vem como uma alternativa promissora para carrear fármacos diretamente às células alvo. O objetivo deste trabalho foi preparar lipossomas sítio-específicos, caracterizar e avaliar a captura celular em macrófagos. Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico e caracterizados através do tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta. A captura celular (*in vitro*) foi realizada através de microscopia de fluorescência utilizando macrófagos J774 e alveolares. Os lipossomas foram obtidos com tamanho $350 \pm 0,01$ nm, com índice de polidispersão de 0,46 e carga de superfície de $-27,83 \pm 0,15$, carga esta que permaneceu negativa mesmo após variação do pH de 2 a 12. Após incubação dos lipossomas foi detectada fluorescência indicando que houve a captura dos mesmos pelos macrófagos J774, no entanto, em macrófagos alveolares fluorescência significativa não foi evidenciada. Observou-se ainda que os lipossomas sítio-específicos foram mais rapidamente capturados (15 minutos) pelos macrófagos J774, em comparação aos lipossomas convencionais (60 minutos) sugerindo que a fucana presente na superfície dos lipossomas otimizou o reconhecimento e conseqüentemente a captura celular. Estudos futuros são necessários para avaliar a influência da fucana no mecanismo de captura celular e entender o porquê e confirmar a não captura pelos macrófagos alveolares.

Palavras-chave: Nanossistemas. Lipossomas. Fucana. Macrófagos.

ABSTRACT

Nanosystem coated polysaccharides, specifically the sulfated ones like fucoidan, is a promising alternative for carrying drugs directly to the target cells. The goal of this study was to prepare site-specific liposomes, characterize and assess the cellular uptake in macrophages. Liposomes have been attained by the hydration method, applied in the lipid film and characterized by particle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential. The cellular uptake (in vitro) was performed through fluorescence microscopy using J774 and alveolar macrophages. Liposomes were obtained with size 350 ± 0.01 nm with polydispersity index of 0.46 ± 0.15 and -27.83 surface charge, which charge remained negative even with the pH range from 2 to 12. Fluorescence was detected after liposomes incubation indicating that they have been uptaken by J774 macrophages, however, in alveolar macrophages the fluorescence was not observed. It was also witnessed that the liposomes site-specific were quickly captured (15 min) by J774 macrophages, compared to conventional liposomes (60min), suggesting that fucoidan present on the surface of the liposomes optimized the recognition and consequently the cellular uptake. Studies are necessary to evaluate the influence of fucoidan in cell endocytic mechanism and confirm, in addition to understand, the reason why the uptake was not achieved by alveolar macrophages.

Keywords: Nanosystems. Liposomes. Fucoidan. Macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Células da linhagem dos monócitos-macrófagos.....	16
Figura 1	Patogênese da tuberculose.	19
Figura 2	Esquema comparativo do tamanho de várias estruturas.	21
Figura 3	Estruturas de lipossomas unilamelar e multilamelar.	22
Figura 4	Diferentes fontes da fucana.	23
Figura 5	Potencial Zeta das formulações revestidas (●) e não revestidas com fucana (■).	27
Figura 6	Microscopia de fluorescência da captura celular de lipossomas sítio-específicos revestidos com fucana em macrófagos (J774) após 0.5h (A), 1h (B) e 5h (C) emacrófagos alveolares após 0.5h (a), 1h (b) e 5h (c).	28
Figura 7	Microscopia de fluorescência da captura celular de lipossomas convencionais (CL) e sítio-específicos revestidos com fucana (FL) em macrófagos (J774) após 15, 30 e 60 minutos.	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral:.....	12
2.2	Objetivos Específicos:	12
3	JUSTIFICATIVA.....	13
4	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
4.1	Sistema imune e Macrófagos	14
4.1.1	Macrófagos.....	14
4.1.2	Função dos macrófagos	15
4.2	Tuberculose.....	16
4.2.1	Epidemiologia.....	17
4.2.2	Patogenia	17
4.2.3	Diagnóstico e tratamento.....	18
4.3	Nanotecnologia.....	19
4.3.1	Sistemas de Liberação Controlada.....	20
4.3.2	Lipossomas	21
4.4	Polissacarídeo Sulfatado – Fucana	22
5	METODOLOGIA.....	25
5.1	Preparação de lipossomas revestidos com polissacarídeo sulfatado.....	25
5.2	Caracterização físico-química dos lipossomas	25
5.2.1	Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão e Carga de superfície	25
5.2.2	Avaliação da captura celular (uptake) <i>in vitro</i> em macrófagos	25
6	RESULTADOS	27
7	DISCUSSÃO	29
8	CONCLUSÕES.....	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Atualmente várias patologias acometem os pulmões, mais especificamente a integridade dos macrófagos alveolares, como por exemplo, a tuberculose (HERNANDEZ et al. 2008). A tuberculose ainda continua sendo uma das principais causas de morte mundial, mesmo com quimioterápicos eficazes para o tratamento. A necessidade de se utilizar diariamente terapia com diversos fármacos e por longo tempo, toxicidade, baixa aceitação por parte dos pacientes e ainda resistência aos fármacos utilizados, são alguns aspectos que explicam a ocorrência de ineficiência dos agentes quimioterápicos (LABANA et al. 2002). Além desses aspectos, a não especificidade dos fármacos às células alvo é um problema que está envolvido na sua baixa eficiência terapêutica. Portanto, o desenvolvimento de sistemas capazes de direcionar o fármaco às células alvo, além de proporcionar uma liberação controlada e uma diminuição dos efeitos tóxicos, torna-se imprescindível para potencializar a eficácia terapêutica dos fármacos antimicrobianos.

A nanotecnologia tem proporcionado o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, como os lipossomas, com habilidade de carrear uma diversidade de compostos bioativos (TORCHILIN, 2007). Atualmente há um grande interesse no desenvolvimento de nanossistemas sítio-específicos através da modificação das propriedades de superfície destas estruturas. Dentre os compostos que podem ser utilizados no revestimento de nanossistemas, os polissacarídeos estão sendo bastante pesquisados.

A fucana é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marrons que vem sendo estudada devido as suas diversas atividades biológicas tais como anticoagulante (USHAKOVA et al. 2009), antiviral (HAYASHI et al. 2008), anti-inflamatória (CUMASHI et al. 2007) e antitumoral (ELLOUALI et al. 1993). Além destas atividades, sabe-se que a fucana é capaz de se ligar aos receptores de membrana encontrados nos macrófagos chamados *macrophages scavenger receptors* (MSR) (KIM; ORDIJA; FREEMAN, 2003).

Neste contexto o revestimento de lipossomas com polissacarídeos sulfatados, especificamente a fucana, pode ser uma alternativa viável para carrear fármacos diretamente aos macrófagos aplicados ao tratamento da tuberculose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Preparar, lipossomas revestidos com fucana, caracterizar e avaliar a captura celular.

2.2 Objetivos Específicos:

- Preparar lipossomas convencionais e revestidos com fucana;
- Caracterizar as formulações obtidas através de tamanho, índice de polidispersão e carga da superfície;
- Avaliar a captura celular dos lipossomas em macrófagos J774 e alveolares.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente vem se alertando tanto para o aumento de novos casos de tuberculose, como para recidivas fazendo com que a doença continue sendo uma das principais causas de morte mundial, mesmo com a disponibilidade de quimioterápicos eficazes para o tratamento. Várias razões estão envolvidas no aumento da prevalência da doença, dentre elas, pode ser citada a baixa adesão ao tratamento pelos pacientes devido aos frequentes efeitos colaterais além da terapia multidrogas. Assim, há uma busca constante por alternativas que minimizem os danos ao paciente melhorando sua adesão ao tratamento e conseqüentemente maior chance de cura. Os sistemas de liberação controlada vêm sendo bastante pesquisados, especialmente os de superfície modificada, sítio-específicos, que são capazes de serem direcionados e levarem o fármaco encapsulado a um tecido ou célula alvo. Como consequência, são necessárias doses terapêuticas menores, proporcionando uma diminuição dos efeitos tóxicos e uma maior eficácia ao tratamento. Assim, lipossomas revestidos com polissacarídeos sulfatados, especificamente a fucana, atuam como uma alternativa para carrear fármacos diretamente aos macrófagos, e dessa forma atuar no combate e tratamento de enfermidades que envolvam essas células.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Sistema imune e Macrófagos

O sistema imune corresponde a um conjunto de elementos que atuam na defesa do organismo contra lesões ou infecções. Barreiras físicas como a pele, substâncias químicas encontradas no sangue e células especializadas constituem o sistema de defesa do indivíduo.

A resposta imunológica é baseada em uma complexa sequência de acontecimentos, tendo início com a introdução de um estímulo (imunógeno ou antígeno) e, geralmente termina com a eliminação do agente causador. As defesas internas se dividem em dois sistemas (1) imunidade inata; (2) imunidade adaptativa, contudo esses sistemas não são totalmente separados, frequentemente as ações de um deles repercute influência no outro (TERR; STITES, 2008; PARSLOW, 2014). A Imunidade inata é relacionada à imunidade já existente no indivíduo desde o nascimento, mesmo antes da apresentação do patógeno, enquanto que a imunidade adaptativa requer uma prévia exposição ao agente agressor, e se torna mais eficaz em exposições subsequentes (TERR; STITES, 2008; PARSLOW, 2014).

As células que fazem parte do sistema imune são: (1) **Linfócitos** também conhecidos como as células brancas, as quais podem se diferenciar em Linfócito B (células que expressam imunoglobulinas em sua membrana) e Linfócitos T (que são originados de células que sofrem maturação no timo); (2) **Granulócitos**, células que apresentam núcleo multilobular e grânulos abundantes, essa classe se divide em: neutrófilos, basófilos e eosinófilos; (3) **Monócitos**, que se diferenciam em macrófagos quando estimulados por diversas substâncias. Todos esses tipos celulares atuam em conjunto nas reações imunológicas desempenhadas tanto pela imunidade inata quanto adaptativa (TERR; STITES, 2008; PARSLOW, 2014).

4.1.1 Macrófagos

Os macrófagos são oriundos de células progenitoras hematopoiéticas imaturas da medula óssea, especificamente monoblasto o qual se desenvolve em

pró-monócito e, em seguida, em monócito na medula óssea. Quando maduros, os monócitos alcançam a circulação sanguínea e uma parte desses monócitos deixa a circulação se alojando em tecidos e tornando-se macrófagos residentes. Praticamente em todos os tecidos, cavidades e órgãos serosas há uma população de macrófagos, contudo em alguns órgãos os macrófagos são abundantes e tomam formas morfológicas distintas recebendo identificação específica (Tabela 1).

Tabela 1. Células da linhagem dos monócitos-macrófagos.

TECIDO	DESIGNAÇÃO
Sangue	Monócitos
Medula óssea	Monócitos e precursores dos monócitos (monoblastos, promonócitos)
Qualquer tecido sólido	Macrófagos residentes (histiócitos) e células dendríticas mielóides
Pele	Células de Langerhans
Fígado	Células de Kupffer
Pulmão	Macrófagos alveolares
Osso	Osteoclastos
Sinóvia	Células sinoviais do tipo A
Sistema nervoso central	Micróglia
Cavidade pleural	Macrófagos pleurais
Cavidade peritoneal	Macrófagos peritoneais
Exsudato inflamatório crônico	Macrófagos do exsudato
Granuloma	Células epitelióides, células gigantes multinucleadas

Fonte: PARSLOW, 2014.

4.1.2 Função dos macrófagos

Embora existam várias denominações para os macrófagos, as funções desempenhadas são as mesmas por todos eles. A principal função consiste em fagocitose, processo pelo qual o antígeno é fagocitado, digerido e então eliminado (TERR; STITES, 2008).

Outras funções podem ser desempenhadas por essas células: (1) servir como células apresentadoras de patógenos para linfócitos ao fagocitar e degradar as substâncias estranhas e, em seguida, expor o material digerido em sua superfície celular; (2) secretar substâncias biologicamente ativas: enzimas, mediadores da

inflamação, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio, componentes do complemento e outros (TERR; STITES, 2008; PARSLOW, 2014).

A ação dos macrófagos, quando comparada a de outro fagócito, o neutrófilo, costuma ser um processo mais lento, as respostas causadas após o englobamento são bem menos expressivas e a digestão ocorre de maneira gradual, porém todos os elementos estranhos são na maioria das vezes totalmente eliminados. Como é o caso de eritrócitos que saem de um vaso e qualquer outra célula do hospedeiro quando sofre apoptose. A maioria das bactérias que são fagocitadas também são eliminadas, exceto algumas micobactérias que conseguem resistir a este processo e replicam dentro dos macrófagos. Ainda existem elementos que conseguem resistir à degradação pelos macrófagos, porém permanecem no interior dessas células, não podendo dessa forma entrar em contato com os tecidos que estão ao redor, como é o caso das partículas de carbono, que permanecem durante anos dentro dos macrófagos alveolares, nos pulmões de fumantes (TERR; STITES, 2008; PARSLOW, 2014).

4.2 Tuberculose

Do grupo das doenças infectocontagiosas, a tuberculose causada pela micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*, tem como alvo principal os pulmões, porém pode acometer outros órgãos e sistemas, podendo gerar alterações graves no sistema imunológico. A disseminação ocorre por via aérea (tosse, espirro e fala) quando são inaladas partículas contendo as bactérias (BRASIL, 2014). Estima-se que um grande percentual das pessoas contaminadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* não desenvolvam a doença ao longo da vida, porém quando há correlação com má nutrição, diabetes e HIV o risco de desenvolver a doença é consideravelmente aumentado (MAHAN; ESCOTT-STUMP; RAYMOND, 2012).

Baseados em evidências arqueológicas e históricas, acredita-se que há mais de 5000 anos a.c. surgiram os primeiros casos de humanos acometidos pela tuberculose, chamada durante a antiguidade de “peste branca”, onde múmias apresentavam anormalidades do comprometimento vertebral, típicas da tuberculose e presença de DNA do *Mycobacterium tuberculosis* nos tecidos (DANIEL, 2000). No Brasil os primeiros casos surgiram durante a colonização portuguesa. Nesse período, jesuítas e colonos infectados provocaram o adoecimento e morte de

diversos índios por manterem contato permanente com os mesmos (CAMPOS, 2001).

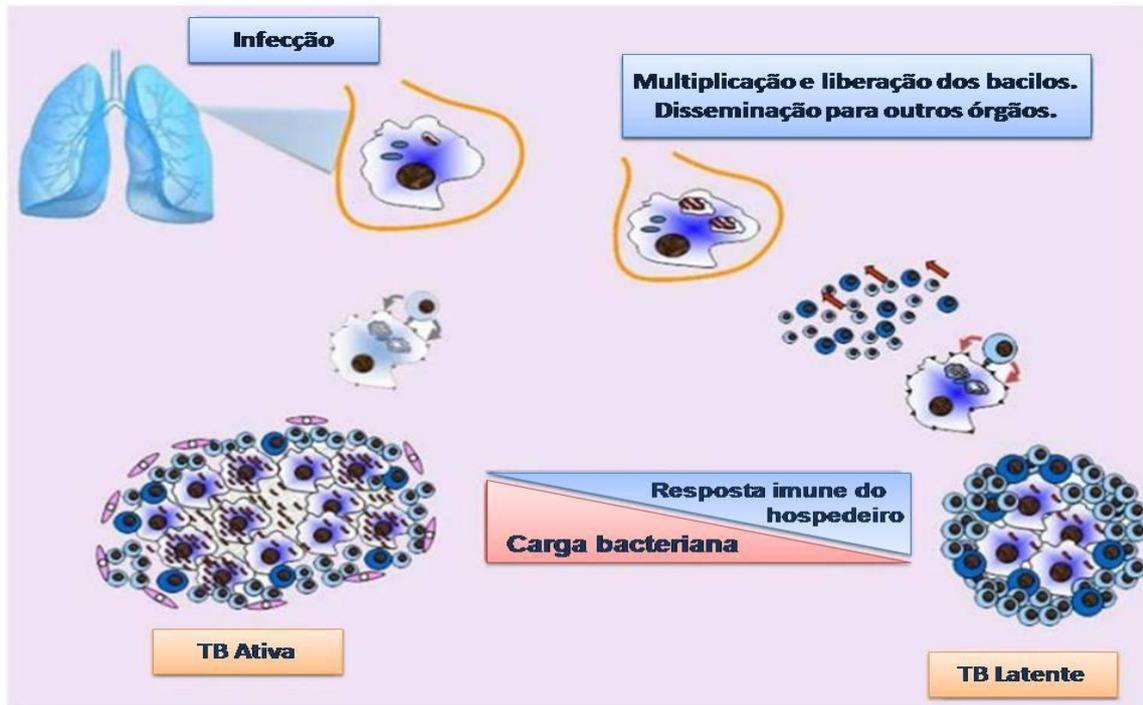
4.2.1 Epidemiologia

Os dados epidemiológicos mostram que em todo mundo, são notificados aproximadamente 6 milhões de novos casos da doença por ano e mais de um milhão de pessoas morrem por esta causa. No Brasil anualmente são notificados 70 mil casos novos e 4,6 mil mortes por tuberculose. Atualmente o país se encontra entre o 17º lugar dentre os 22 países que juntos somam 80% dos casos de tuberculose no mundo (BRASIL, 2014).

4.2.2 Patogenia

As bactérias quando são inaladas podem desencadear três diferentes situações no hospedeiro: (1) eliminação do agente pelo complexo imune do hospedeiro; (2) o sistema imune não contém os agentes e é então estabelecida a tuberculose; ou ainda (3) as bactérias são contidas pelo sistema imune em granulomas, e permanecem na forma latente podendo posteriormente desenvolver a tuberculose (NORBIS et al, 2013). A infecção tem início quando os bacilos alcançam os alvéolos, lá são rapidamente fagocitados pelos macrófagos alveolares que atuam por meio da resposta inata do hospedeiro. Caso consigam passar por essa barreira, as bactérias multiplicam-se e se difundem para outras células. Após a primeira reação inflamatória o corpo lança mão da imunidade adaptativa, que forma um infiltrado celular, em seguida toma conformação de granuloma com elementos fibróticos tornando-o calcificado, os bacilos ficam na forma latente dentro do granuloma (Figura 1). A doença se torna ativa quando o sistema imune falha, por mecanismos ainda desconhecidos, e os bacilos se multiplicam, desencadeando os primeiros sinais e sintomas (DELOGU; SALI; FADDA, 2013).

Figura 1. Patogênese da tuberculose.



Fonte: (DELOGU; SALI; FADDA, 2013. Traduzido pelo autor). Os bacilos da tuberculose (TB) ao serem inalados em gotículas presentes no ar entram nos pulmões e, quando a resposta imunológica inata não consegue eliminar as bactérias, essas começam a se multiplicar dentro dos macrófagos alveolares e depois se espalham para outros tecidos e órgãos através da corrente sanguínea e linfática. Uma vez que a resposta imune mediada por células é ativada, a replicação bacteriana geralmente é controlada e em 90-95% dos casos os sinais ou sintomas da doença não se tornam aparentes (TB latente). Durante a infecção latente um equilíbrio dinâmico entre os bacilos e respostas imunitárias do hospedeiro é estabelecido e qualquer caso em que enfraquece a imunidade mediada por células pode conduzir à replicação bacteriana ativa, provocando danos nos tecidos e a doença ocorre (TB ativa).

4.2.3 Diagnóstico e tratamento

Para o diagnóstico da tuberculose são utilizados exames de radiografia de tórax, baciloscopia do escarro e ainda pode ser necessário um lavado brônquico para isolamento da bactéria. Quando a tuberculose é do tipo extrapulmonar, o diagnóstico geralmente é realizado por exames de imagem, pesquisa direta do bacilo e cultivo de secreções, no entanto dependerá da localização da tuberculose (COURA, 2008).

O tratamento corresponde a utilização de esquemas com diversos antibióticos. No Brasil são padronizados os seguintes medicamentos: Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, Etionamida, Etambutol e Estreptomicina. Esses fármacos anti-

tuberculose são organizadas em esquemas de tratamento que podem variar de acordo com a idade do paciente, se é retorno ao tratamento após abandono, retratamento, caso novo e outros fatores. Contudo, para todos os casos a cultura e o teste de sensibilidade devem ser realizados (FERRI, 2014; COURA, 2008).

Os esquemas elaborados com medicamentos utilizados para o tratamento da tuberculose são eficazes, contudo a não adesão ao tratamento ainda é um dos principais motivos para o aumento da incidência e mortalidade associadas à doença, além do aparecimento de bacilos multirresistentes. Ademais, outro fator que deve ser considerado é a coexistência de AIDS, que causa imunocomprometimento do paciente (DROBNIIEWSKI et al., 2013).

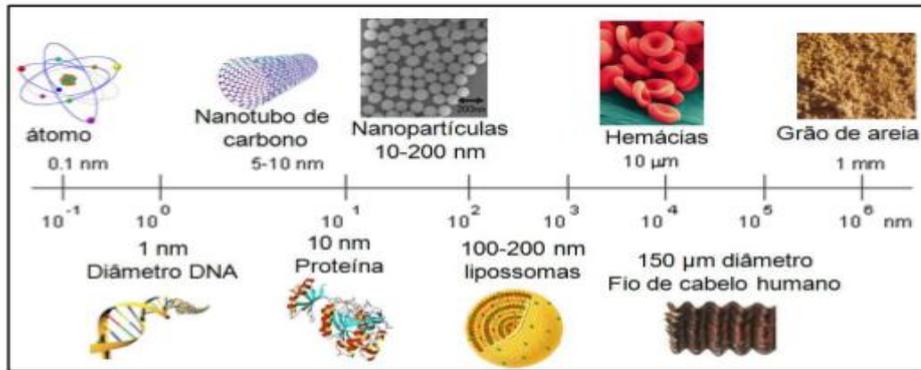
Com maior frequência o abandono do tratamento acontece por pacientes de populações com baixo nível educacional e socioeconômico. Porém, ainda assim os principais motivos para abandono são os efeitos adversos, causados pelos medicamentos como náusea, vômito, dor abdominal, prurido ou exantema leve, neuropatia periférica, hiperucemia sem sintomas, ansiedade, insônia, euforia, suor, urina de cor avermelhada, cefaléia e hiperurecemia com artralgia (BRASIL, 2011).

4.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a tecnologia que vem sendo utilizada para manipular estruturas muito pequenas, tornando possível a criação de estruturas funcionais que seriam inviáveis utilizando tecnologia convencional. De cunho multidisciplinar, une diversas áreas de conhecimento, como: física, biologia, química e engenharias. Por apresentarem estruturas na escala nanométrica, a nanotecnologia proporciona grandes benefícios e por esta razão, é agora um dos campos mais importantes e explorados mundialmente (DURÁN; MARCATO; TEIXEIRA, 2010).

A nanotecnologia tem proporcionado o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, como os lipossomas, com habilidade de carrear uma diversidade de compostos bioativos (TORCHILIN, 2007).

Figura 2. Esquema comparativo do tamanho de várias estruturas.



Fonte: LIRA, 2009.

4.3.1 Sistemas de Liberação Controlada

Uma atenção considerável está voltada para o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de fármacos nos últimos anos. Uma explicação para este fato é que a utilização da grande maioria dos compostos terapêuticos sempre apresenta limitações pela impossibilidade de aumento de dosagem (HENRIQUE; PALCARE; LOPES, 2006). Problemas ligados à utilização de concentrações elevadas do fármaco levaram os pesquisadores a desenvolverem sistemas capazes de transportar o fármaco até um alvo específico e, dessa forma, diminuiriam os efeitos indesejáveis resultantes de sua ação em outros sítios. Ainda, por estarem ligados a um carregador (transportador), os fármacos encapsulados conseguem superar algumas propriedades físico-químicas limitantes como uma baixa hidrossolubilidade. (HENRIQUE; PALCARE; LOPES, 2006).

Essa tecnologia envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir de forma significativa para o avanço da saúde humana, além de oferecer inúmeras vantagens quando comparados a outras formas farmacêuticas de dosagens convencionais. De acordo com Durán e colaboradores (2010) tais vantagens seriam: I. Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; II. Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; III. Administração segura, sem reações inflamatórias locais; IV. Natureza e composição dos veículos, além de proteção contra mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (inativação prematura); V. Diminuição do número de doses devido a liberação progressiva; VI. Possibilidade de direcionamento a alvos específicos.

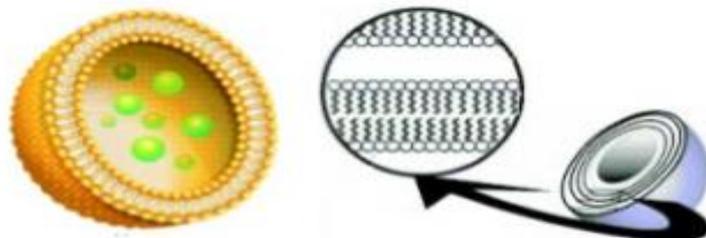
4.3.2 Lipossomas

Lipossomas são vesículas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Essas vesículas podem encapsular substâncias lipofílicas e/ou hidrofílicas, ficando a primeira inserida ou adsorvida na membrana e as hidrofílicas no compartimento interno aquoso (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Constituídos basicamente por fosfolipídios, os lipídeos mais utilizados nas preparações de lipossomas são as fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolinas e esfingomiélin, que tendem a formar uma bicamada estável quando colocados em solução aquosa. Dentre eles a fosfatidilcolina é a mais utilizada para formulação de lipossomas, pela característica de apresentar grande estabilidade diante de variações de pH ou da concentração de sal no meio (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Conforme pode ser observado na figura 3, os lipossomas podem apresentar apenas uma bicamada lipídica ou múltiplas bicamadas em torno de sua região central e, portanto, são classificados em unilamelar e multilamelar, respectivamente (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). A maioria dos fosfolipídios não formam naturalmente lipossomas unilamelares, sendo necessário a submissão desses lipossomas a uma fonte de energia, como por exemplo ultrassom (sonicação) (CHORILLI, M. et al., 2004).

Figura 3. Estruturas de lipossomas unilamelar e multilamelar.



Fonte: CHORILLI, 2004.

Com a intenção de aumentar a especificidade de interação de lipossomas com células alvo e aperfeiçoar o efeito terapêutico nestas células, a superfície dos

lipossomas pode ser modificada por meio da escolha de lipídeos que permitam a ligação de uma variedade de elementos por meio do reconhecimento. Como por exemplo, a fosfatidiletanolamina que apresentam um grupo amino, e colesterol ou polietilenoglicol que contém um grupo hidroxila (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Exemplos de ligantes que podem ser usados com o objetivo de alcançar a sítio especificidade dos lipossomas são os anticorpos, glicopeptídeos, polissacarídeos, proteínas virais e lectinas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

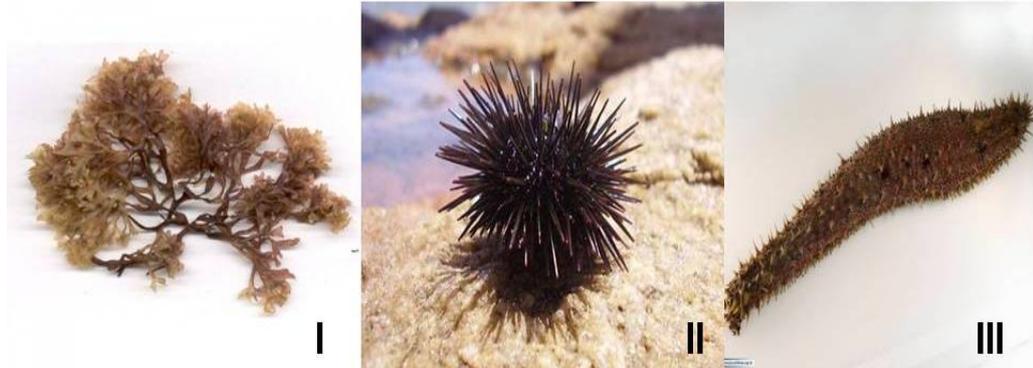
Atualmente há um grande interesse no desenvolvimento de nanossistemas com superfície modificada com o objetivo de direcionar os sistemas a um local alvo, tornando-os sítios-específicos. Dentre os compostos que podem ser utilizados no revestimento de nanossistemas, os polissacarídeos estão sendo bastante pesquisados.

4.4 Polissacarídeo Sulfatado – Fucana

Os polissacarídeos são a forma de carboidrato mais encontrada na natureza, e refere-se a polímeros de médio a alto peso molecular. Podem receber a denominação de glicanos e diferem entre si no comprimento das cadeias, tipos de ligações unindo as unidades, identidade de monossacarídeos repetidos e grau de ramificação (NELSON; COX, 2011). O estudo crescente dos polissacarídeos é reflexo das várias atividades biológicas importantes que apresentam (RODRIGUES et al., 2009).

A fucana é um polissacarídeo sulfatado extraído da parede celular de espécies de algas marrons (MATSUBARA 2001 apud, WANG et al., 2010) e de equinodermas (MOURÃO, 2007) (Figura 4). Tem sido relatada por apresentar diversas propriedades bioativas de valor medicinal, como anticoagulante, anti-tumoral, anti-inflamatória, antiviral e antioxidante. Esse polissacarídeo é capaz de ser reconhecido e de ligar-se aos receptores de membrana encontrados nos macrófagos chamados *macrophages scavenger receptors*, (MSR) (KIM; ORDIJA; FEEMAN, 2003).

Figura 4. Diferentes fontes da fucana. (I) Algas marrons, (II) ouriço do mar, (III) pepino do mar.



As estruturas da fucana variam de espécies para espécies de algas e, às vezes, em diferentes partes da mesma. A explicação para essa grande complexidade na estrutura desse polissacarídeo são as várias alternativas de ligações entre as diferentes unidades monoméricas e as possíveis distribuições dos grupos sulfato. Sendo assim, os mesmos podem ser homopolímeros que apresentem estruturas complexas, podendo, cada fucana apresentar uma conformação estrutural única, e, dessa forma, possuir atividades farmacológicas distintas ou mais potentes que outras ou outros compostos bioativos já descritos (ROCHA, 2002).

Em uma análise feita por LIMA (2009), foi avaliada a toxicidade da fucana extraída por despigmentação e delipidação, com a adição de acetona da alga marrom *Spatoglossum schröderi*. Nos testes *in vitro* foram utilizadas células de ovário de hamster Chinês e não foram observadas alterações mutagênicas nas três concentrações utilizadas no estudo (20, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). Nos testes *in vivo* foram administradas doses de 20 $\mu\text{g/g}$ de peso do animal, pela via subcutânea, sendo administrada uma única dose diária, por um período de 2 meses. Não foram observadas alterações significantes nos parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue, e morfológicos dos órgãos dos animais (cérebro, timo, pulmões, coração, baço, fígado, rins, testículos e próstata) sugerindo que a fucana, na concentração estudada, não apresenta toxicidade.

Em um estudo prévio realizado por Kim e colaboradores (2003) avaliou-se o potencial de ligação entre a fucana e os macrófagos. Foram utilizados macrófagos da linhagem J774 e macrófagos retirados da membrana peritoneal de ratos, em ambos foi possível observar após o tratamento com fucana que houve resposta celular. O polissacarídeo foi capaz de ligar-se ao macrófago e desencadear fosforilação via tirosina quinase. Esses achados sugerem que a fucana é capaz de ser reconhecida e de ligar-se aos receptores de membrana encontrados nos macrófagos chamados *macrophages scavenger receptors*. Portanto, estes resultados são sugestivos de uma possível ação de nanocarreadores revestidos com a fucana para direcionamento sítio-específico aos macrófagos.

Assim, este trabalho teve como proposta a união de áreas estratégicas como a nanotecnologia e a utilização de produtos naturais derivados de algas marinhas, para o desenvolvimento de novos nanocarreadores sítio-específicos como uma possível utilização em macrófagos infectados por micobactéria.

5 METODOLOGIA

5.1 Preparação de lipossomas revestidos com polissacarídeo sulfatado

Os lipossomas revestidos com polissacarídeo foram obtidos de acordo com o método de formação do filme lipídico, segundo metodologia validada por Lira et al. (2009). Os lipídios (fosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina 80 mM) foram solubilizados em uma mistura de solventes orgânicos clorofórmio: metanol (3:1) e em seguida realizou a retirada dos solventes por rota-evaporação. O filme formado foi então hidratado com solução de fucana hidrofobizada (20 mg), em 10 mL previamente extraída da alga *Fucus vesiculosus* e ligada ao colesterol, em tampão fosfato pH 7,4 para formação das vesículas lipídicas a partir de homogeneização manual até remoção completa do filme lipídico. Estas vesículas foram submetidas a sonicação por ultrassom (200 W, 50 Hz por 300 segundos) para redução do número de lamelas e tamanho. Formulações lipossomais fluorescentes foram obtidas pela mesma metodologia utilizando 100 µL de uma solução do marcador fluorescente Rodamina (Sigma) (2mg/mL).

5.2 Caracterização físico-química dos lipossomas

5.2.1 Tamanho de Partícula, Índice de Polidispersão e Carga de superfície

O tamanho de partícula foi analisado a 20°C pela dispersão de luz utilizando o Nanosizer[®] N4 PLUS (Beckman-Coulter) utilizando 300 segundos de sonicação (pulsação de 50% e 50 mV). A carga de superfície foi determinada utilizando o Zetasizer 4 (Malvern Instruments Ltd). Para as análises a formulação lipossomal (20 µL) foi diluída em 1mL de água purificada. Os resultados foram determinados a partir da media de três análises.

5.2.2 Avaliação da captura celular (uptake) *in vitro* em macrófagos

Com objetivo de avaliar a influência da fucana na captura dos lipossomas revestidos pelos macrófagos, foi realizado o uptake celular *in vitro* utilizando-se macrófagos J774 e macrófagos alveolares. Ambas células foram mantidas no Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células (NanoBioCel - CAV), utilizando meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB)

(Gibco) e antibióticos (penicilina 50 IU/mL e estreptomicina 50 UI/mL), com atmosfera de CO₂ 5% a 37°C. Após contagem das células, as mesmas foram transferidas para placas cultura de 12 poços (10⁵ células/poço) contendo lamínula redonda e incubadas por 24 horas. (LIRA et al. 2011). Após incubação, os lipossomas foram inseridos nas placas de cultura contendo as células e em tempos pré-determinados o meio foi retirado, acrescentaram-se 800µL de paraformaldeído por 20 minutos e em seguida 1mL de cloreto de amônia. Finalmente, as lamínulas foram retiradas, fixadas em lâminas e observadas em microscopia de fluorescência..

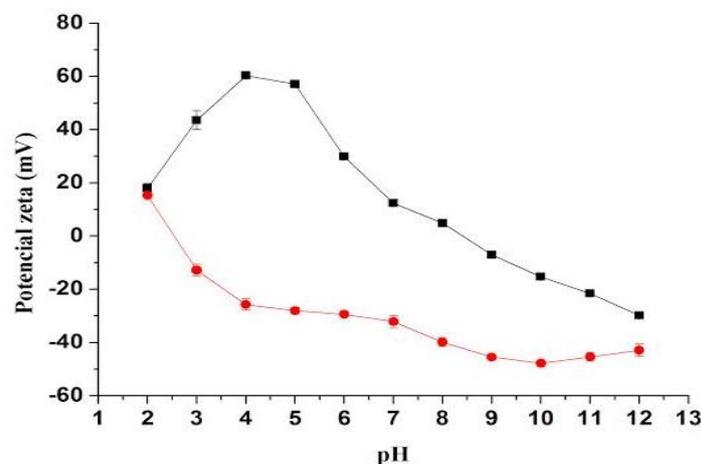
6 RESULTADOS

Um tamanho médio das vesículas de $5,87 \pm 0,61 \mu\text{m}$ foi obtido com o tempo de 300 segundo de sonicação (pulsação de 50% e 50 mV). O Índice de Polidispersão foi avaliado a partir do mesmo equipamento utilizado para a avaliação do tamanho, após análise, obteve-se um valor de 0,48 para as formulações. A carga de superfície dos lipossomas revestidos com fucana foi determinada utilizando o Zetasizer 4 (Malvern Instruments Ltd), obtendo um valor médio de $-30 \pm 0,05\text{mV}$.

Apesar do êxito na preparação dos lipossomas revestidos com fucana, na obtenção de formulações monodispersas e na presença de carga negativa, o tamanho das vesículas encontrou-se acima do desejado para uma futura administração injetável. Deste modo, após análise dos resultados o tempo de sonicação foi modificado, aumentando para 500 segundo com o objetivo de diminuir o tamanho das vesículas e obtenção de lipossomas na escala nanométrica. Após a sonicação, as vesículas apresentaram tamanho médio de $350 \pm 0,01 \text{ nm}$, com índice de polidispersão de 0,46 e carga de superfície de $-27,83 \pm 0,15\text{mV}$.

A fim de avaliar a estabilidade dos lipossomas em diferentes pH's, o potencial zeta das formulações, revestidas e não revestidas com fucana, foi avaliado variando-se o pH de 2 a 12 (Figura 5).

Figura 5. Potencial Zeta das formulações revestidas (●) e não revestidas com fucana (■).



A captura celular dos lipossomas foi avaliada *in vitro* utilizando macrófagos J774 e alveolares. Após incubação das células com as formulações não foram

observadas modificações morfológicas, indicando que a concentração utilizada não foi tóxica para as células, uma vez que foi escolhida concentração abaixo da IC_{50} ($10.47\mu M$). Os resultados de captura celular estão ilustrados nas figuras 6 e 7.

Figura 6. Microscopia de fluorescência da captura celular de lipossomas sítio-específicos revestidos com fucana em macrófagos (J774) após 0.5h (A), 1h (B) e 5h (C) e macrófagos alveolares após 0.5h (a), 1h (b) e 5h (c).

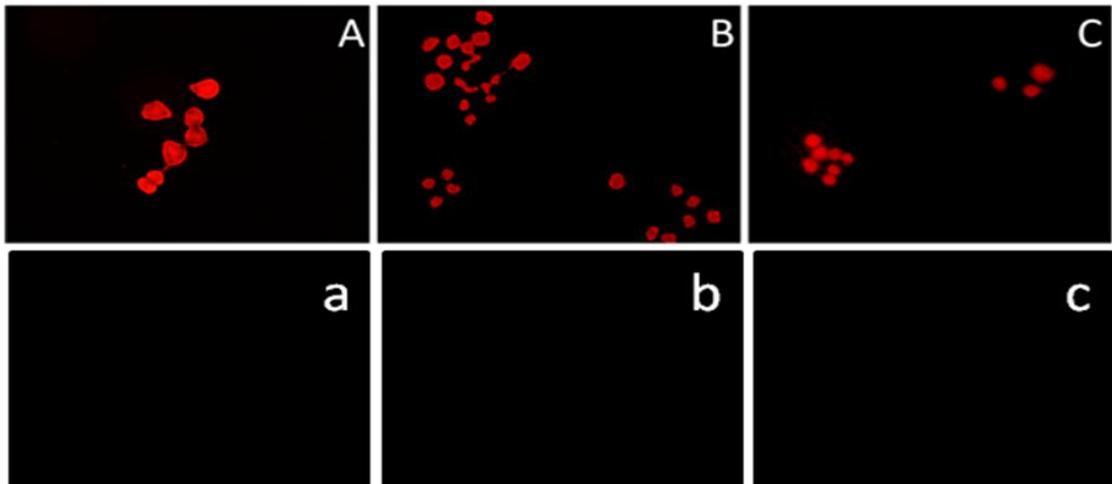
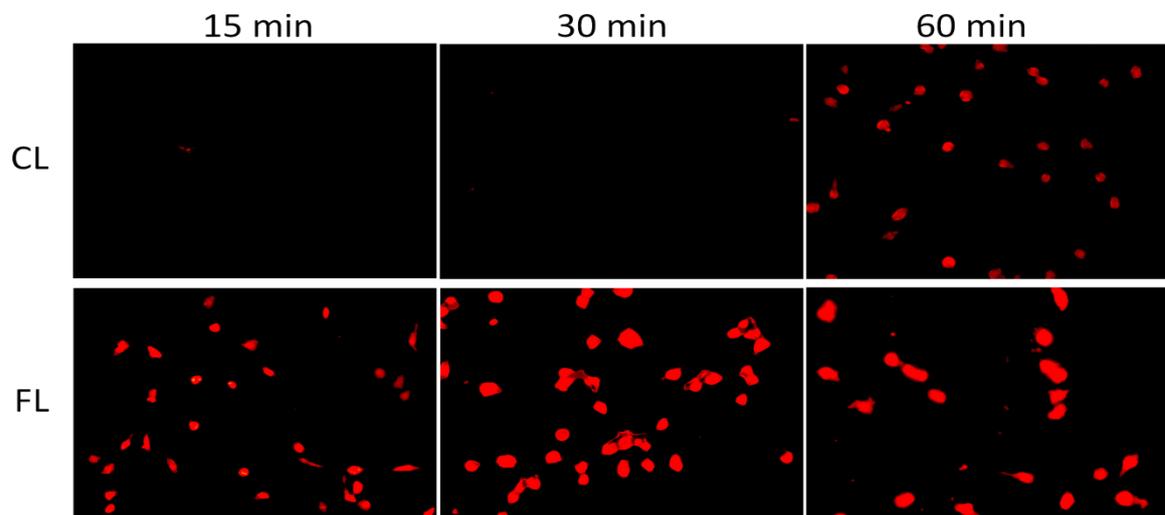


Figura 7. Microscopia de fluorescência da captura celular de lipossomas convencionais (CL) e sítio-específicos revestidos com fucana (FL) em macrófagos (J774) após 15, 30 e 60 minutos.



7 DISCUSSÃO

A determinação do tamanho de partículas, o índice de polidispersão e a carga da superfície (potencial Zeta) são parâmetros importantes na caracterização dos nanossistemas, e determinam as características físico-químicas dos lipossomas. Dependendo destas características a estabilidade, o comportamento *in vitro* e/ou *in vivo* pode ser alterado. Ambos apresentaram valores satisfatórios para desenvolvimento do experimento.

O índice de polidispersão encontrado para a formulação evidenciou que os lipossomas encontravam-se monodispersos, resultado evidenciado tanto pelo baixo índice de polidispersão, menor que 1, como pelo aparecimento de um único pico. Segundo Hinrichs e colaboradores (2006), valores menores que 1 e mais próximos de 0 indicam homogeneidade da formulação, enquanto valores acima de 1 apontam formulações polidispersas, ou seja formulações com populações de tamanhos distintos.

A carga de superfície dos lipossomas revestidos com a fucana apresentou-se negativa. Este valor negativo pode sugerir que a fucana está localizada na superfície dos lipossomas, uma vez que a mesma apresenta carga negativa e, contrariamente, os lipossomas não revestidos com fucana apresentam carga positiva devido a presença de lipídeo catiônico. O valor do potencial zeta encontrou-se dentro de uma faixa adequada capaz de proporcionar repulsão eletrostática entre as vesículas conforme descrito por Calvo e colaboradores (1996) e Lapenda e colaboradores (2012).

Observou-se que nas formulações não revestidas com fucana o ponto isoelétrico apresentou valor de 8,14 e houve variação do potencial zeta em decorrência da modificação do pH. Por outro lado, as formulações revestidas com fucana, mesmo variando o pH de 2 a 12 o potencial zeta continuou negativo sugerindo que a fucana permaneceu ligada à superfície dos lipossomas. Nestas formulações o ponto isoelétrico encontrado foi de 2,78.

A figura 6 representa um comparativo entre a captura celular em macrófagos J774 e alveolares. A figura mostra fluorescência indicando que houve captura do marcador utilizado (Rhodamina). Nos macrófagos J774 houve captura a partir de

meia hora e essa fluorescência continuou sendo observada após as 5 horas do experimento. Em estudo prévio Lira e colaboradores (2011) utilizando nanopartículas revestidas com fucana, observaram que o início da fluorescência em macrófagos J774 só foi percebido após a primeira hora tendo sua intensidade máxima em 24 horas. Contrariamente ao que esperávamos, não foi observada fluorescência após incubação das formulações com macrófagos alveolares, sugerindo que não houve uma captura significativa.

Com objetivo realizar um comparativo entre a captura dos lipossomas convencionais e revestidos com fucana em relação ao tempo, novamente o ensaio de uptake celular foi realizado seguindo-se a mesma metodologia descrita. A figura 7 mostra que a partir de 15 minutos os lipossomas revestidos com fucana foram mais rapidamente capturados pelos macrófagos (Figura 7. FL) em comparação aos lipossomas convencionais (Figura 7. CL) que só foi possível observar a captura após 60 minutos. Este resultado sugere que a fucana presente na superfície dos lipossomas pode ter otimizado o reconhecimento dos lipossomas pelos macrófagos e, conseqüentemente, a captura celular.

8 CONCLUSÕES

Lipossomas sítio-específicos revestidos com fucana foram obtidos e caracterizados. Os mesmos foram mais rapidamente capturados pelos macrófagos em comparação aos lipossomas convencionas sugerindo que a fucana pode ter influenciado no reconhecimento celular. Não foi observada captura pelos macrófagos alveolares fato este que deve ser mais detalhadamente investigado. Estudos são necessários para avaliar a influência da fucana no mecanismo de endocitose celular e entender o porquê e confirmar a não captura pelos macrófagos alveolares.

REFERÊNCIAS

BATISTA C.M.; CARVALHO C.M.B.; MAGALHÃES N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 2, p. 167-179, abr./jun., 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Tuberculose**. 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=11045&Itemid=674> Acesso em: 17/ ago. 2015.

_____. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011 Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf Acesso em: 23 ago. 2015.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J., Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **Journal Pharmaceutical Science**, v.85, p. 530, 1996.

CAMPOS, R. P.C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, **Bol da Saúde**, Rio Grande do Sul, v. 15, n. 1, p. 61-71, 2001.

CHORILLI, M. et al. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**, v.16, nº 7-8, 2004.

COURA, J. R. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

CUMASHI, A. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, p. 541-552, 2007.

DANIEL, T.M. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?. **International Journal of Tuberculosis Lung Disease**, v.4 n.5, p. 395-400, 2000.

DELOGU, G.; SALI, M.; FADDA, G. The biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. **Mediterranean Journal of Hematology Infectious Diseases**, Roma, v. 5, n. 1, 2013.

DROBNIIEWSKI, F. et al. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. **BMC Medicine**, New York, v. 11, n. 190, p. 1-11, 2013.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, Z.. **Nanotecnologia e nanobiotecnologia**: conceitos básicos. São Paulo, p. 1, 04 out. 2010. Disponível em: <http://nano.iiep.org.br/sites/default/files/conceitos_basicos_nano.pdf>. Acesso em: 28 out. 2015.

EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J.; Liposomes in analyses. **Talanta**, London, v. 68, n. 5, p. 1432 – 1441, 2006.

ELLOUALI, M. et al. Antitumor activity of low molecular weight fucoidans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*, **Anticancer Research** v.13 p. 2011–2020, 1993.

FERRI, A. O. et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 15, n. 24, p. 105-212, jul./dez. 2014.

HAYASHI, K. et al. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 109–116, 2008.

HENRIQUE J.S.; PALCARE, R.S.; LOPES, P.S. Sistemas de liberação controlada. Brasília, **Revista Pharmacia Brasileira**, Ano x, n. 56, p. 22, Nov/dez, 2006.

HERNANDEZ, C. et al. Tuberculosis in the age of biology therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, p. 363-380, 2008.

HINRICHS, W.L.J. et al. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying. **International Journal of Pharmaceutics**.v.311, 237–244, 2006.

KIM, W.S.; ORDIJA, C.M.; FREEMAN, M.W. Activation of signaling pathways by putative scavenger receptor class A (SR-A) ligands requires CD14 but not SR-A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 310, p. 542 – 549, 2003.

LABANA, S. et al. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.20, p. 301-304, 2002.

LAPENDA, T. L. S. et al. Encapsulation of Trans-Dehydrocrotonin in Liposomes: An Enhancement of the Antitumor Activity. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, 1–12, 2012.

LIMA, J. A. **Análise toxicológica in vitro e in vivo de uma fucana antitrombótica da alga marrom *Spatoglossum schröderi***. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica Natal, 2009.

LIRA, M.C.B. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 162-70, 2011.

LIRA, M.C.B. et al. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v.19, p.49 - 58, 2009.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S.; RAYMOND, J. L. **Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. Elsevier, Rio de Janeiro 2012.

MOURÃO, P. A. S. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in search in fertilization. **Brazilian Journal of Medical Biological Research.**, v. 40, p.5-17, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NORBIS, L. et al. Tuberculosis: light shadows in the current diagnostic landscape. **New Microbiologica**, Bologna, v. 36, n. 2, p. 111-120, 2013.

PARSLOW, T. G. **Imunologia médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2014.

ROCHA, H. A. O. **Caracterização de uma fucana da alga *Spatoglossumschröderi* e análise de suas atividades anti-adesiva, antimigratória, antiproliferativa e antitrombotica**. 2002. 205f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Paulo. Departamento de Bioquímica, São Paulo, 2002.

RODRIGUES, J. A. G. et al. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymeniapseudofloresia*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009.

TERR, A. I.; STITES, D. P. **Imunologia básica**. Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 2008.

TORCHILIN, V. P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. **The AAPS Journal** . V. 9, p. E128-147, 2007.

USHAKOVA, N.A. et al. Anticoagulant activity of Fucoidans from brown algae. **Biochemistry Supplement Série B: Biomedical Chemistry**, v. 3, p. 77–83, 2009.

WANG, J. et al. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions from *Laminaria japonica*. **International journal of Biological Macromolecules**. V. 46, p. 6-12, 2010.