



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA VERMELHA
Solieria filiformis (SOLIERIACEAE, RODOPHYTA).**

GRAZIELLE DA COSTA PONTES

**Monografia apresentada ao Departamento
de Engenharia de Pesca do Centro de
Ciências Agrárias da Universidade Federal
do Ceará, como parte das exigências para a
obtenção do título de Engenheiro de Pesca.**

**FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
JUNHO/2005**



COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias

Prof. Alexandre Holanda Sampaio

Prof. Manuel A. Andrade Furtado Neto

VISTO:

Prof. José Wilson Calíope de Freitas, D.Sc
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Profª. Artamizia Maria Nogueira Montezuma, M.Sc
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P858e Pontes, Grazielle da Costa.

Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados extraídos da Alga Marinha vermelha *Solieria filiformes* (Solieriaceae, Rodophyta) / Grazielle da Costa Pontes. – 2005.

39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2005.

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Alga Marinha vermelha - Cultivo. 2. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

Dedico este trabalho aos meus pais, do qual sempre recebi apoio incondicional. Agradeço também ao meu marido, José Tarcísio, pelo seu amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela alegria em me conceber a realização de mais sonho na minha vida. Tenho certeza que essa etapa foi fundamental para alcançar os novos horizontes que, com certeza, virão.

Aos meus pais, que apesar das dificuldades, sempre me apoiaram e nunca deixaram de faltar o poder aquisitivo para ocupar uma cadeira na sala de aula nesta instituição de ensino superior.

Ao meu marido, José Tarcísio, pelo amor e amizade no qual sempre estive ao meu lado nesta caminhada.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Wladimir, pela paciência em me ensinar, pela compreensão dos erros cometidos, principalmente pela atenção e dedicação pela área no qual também escolhi.

Um especial agradecimento à professora, Silvana Saker, pela amizade e atenção nos momentos quando necessitei de alguma ajuda, e ao professor Alexandre Sampaio, pelo exemplo de dedicação à profissão escolhida.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica Marinha do DEP, em especial José Ariévilo e Valeska,

Também, os meus agradecimentos a todos os professores do Departamento de Engenharia de Pesca que fazem essa instituição de ensino melhorar a cada dia.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	v
RESUMO	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i>	1
1.2. Os polissacarídeos sulfatados	3
1.3. Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados	4
1.3.1. A atividade anticoagulante	6
1.3.1.1. A coagulação sangüínea	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1 - Coleta do material	9
2.2. Extração de polissacarídeos sulfatados	9
2.2.1 Método I	9
2.2.2. Método II	11
2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados brutos em coluna de troca iônica	12
2.4. Atividade metacromática nas frações obtidas no fracionamento	12
2.5. Detecção da presença de açúcar nas frações obtidas no fracionamento	12
2.6. Atividade anticoagulante nas frações obtidas no fracionamento	13
2.7. Determinação da condutividade nas frações obtidas no fracionamento	13

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1. Extração de polissacarídeos sulfatados	14
3.2. Fracionamento em DEAE-celulose	15
3.3. Atividade anticoagulante (APTT) das frações obtidas na coluna de troca-iônica.	23
4. CONCLUSÕES	25
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

RESUMO

A procura de novas substâncias anticoagulantes é justificada devido os efeitos adversos da heparina. Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas que vêm sendo estudadas com esse propósito e são encontradas abundantemente nas algas marinhas. Este trabalho teve como objetivo de extrair, purificar e avaliar as atividades anticoagulante dos PS da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. Para ambos os métodos, a extração iniciou-se a partir de 2 gramas do material seco e triturado, que foi hidratado com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + EDTA 5mM + cisteína 5mM. Em seguida, adicionou-se uma solução de papaína (30 mg/mL), sendo a mistura incubada a 60°C por 24 horas. O primeiro método de extração foi realizado com cloreto de cetilpiridínio (CPC) e álcool etílico, enquanto o segundo método foi realizado apenas com álcool etílico para a precipitação dos PS. Em seguida o material foi levado à estufa a 60°C para secagem, obtendo-se os PS total bruto. Após a obtenção dos PS, esses foram fracionados em coluna de troca-iônica, eluída com diferentes concentrações de NaCl. A atividade anticoagulante nas frações foi determinada através do teste do APTT, utilizando um coagulômetro. A detecção da presença de açúcar nas frações foi realizada através do teste de DUBOIS. O método de extração com CPC e álcool etílico apresentou um rendimento total de 43,40% em um total de 3 incubações, com os seguintes rendimentos parciais: 432; 290 e 118 mg. Com o método de extração somente com álcool etílico, obteve-se um rendimento total de 46,8% com os seguintes rendimentos parciais: 504; 322 e 110 mg, considerando o mesmo número de incubações. Os perfis metacromáticos dos PS foram diferentes, tanto entre os métodos de extrações como entre as incubações do mesmo método. De maneira geral, os polissacarídeos sulfatados da alga *Solieria filiformis* apresentaram baixa atividade anticoagulante. As frações eluídas com 1,2 M de NaCl na 1ª incubação (M I) e com 1,4 M de NaCl na 1ª incubação (M II) foram as que obtiveram maior atividade anticoagulante.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** A alga marinha vermelha *Solieria filiformis* mostrando o talo cilíndrico (a) com as suas extremidades agudas (b). 2
- FIGURA 2.** Estrutura de um proteoglicano (“agregan”) mostrando a proteína central em azul e as cadeias de condroitim sulfato(CS) e queratam sulfato (KS). 3
- FIGURA 3.** Fluxograma mostrando os procedimentos realizados no método de extração 10
- FIGURA 4.** Fluxograma mostrando os procedimentos realizados no método de extração 11
- FIGURA 5.** Rendimentos parciais das extrações de polissacarídeos sulfatados da alga *Solieria filiformis* obtidos pelos dois métodos de extração. 14
- FIGURA 6.** Rendimento total das extrações de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* obtidos pelos métodos I e II. 15
- FIGURA 7.** Metacromasia, presença de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas nas frações obtidas na 1^a incubação pelo método I de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* 16
- FIGURA 8.** Metacromasia, presença de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 2^a incubação pelo método I de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. 17

- FIGURA 9.** Metacromasia, presença de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 3^a incubação pelo método I de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. 18
- FIGURA 10.** Metacromasia, presença de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 1^a incubação pelo método II de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. 19
- FIGURA 11.** Metacromasia, presença de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 2^a incubação pelo método II de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. 20
- FIGURA 12.** Metacromasia, presença de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 3^a incubação pelo método II de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. 21

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Atividade anticoagulante das frações obtidas no fracionamento dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha <i>Solieria filiformis</i> , utilizando dois métodos de extração (MI e MII).	22
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis* (SOLIERACEAE, RODOPHYTA).

GRAZIELLE DA COSTA PONTES

1. INTRODUÇÃO

As rodofíceas são separadas dos outros grupos de algas eucarióticas por um conjunto de características, quais sejam: ausência completa de estágios flagelados, presença de ficobilinas (pigmentos fotossintetizantes acessórios), ocorrência de tilacóides não agregados nos cloroplastos, “amido das florídeas” como produto de reserva e a reprodução sexuada oogâmica envolvendo a célula feminina (carporgônio) e o elemento masculino (espermácio) (BOLD, WYNNE, 1978).

Segundo NORRIS, KUGRENS (1982) um grande número de espécies de rodofíceas habita o ambiente marinho e apenas um pequeno número o de águas continentais. A maioria das espécies ocorre desde a zona das marés até à profundidade de cerca de 200m em mares tropicais, subtropicais, temperados e poucas são encontradas nas regiões boreais e sub-boreais.

OLIVEIRA FILHO (1977) apresenta um histórico completo da Ficologia Marinha no Brasil e relaciona 128 gêneros e 327 espécies de rodofíceas.

1.1. Alga marinha vermelha *Solieria filiformis*

Segundo MIN-THEIN, WOMERSLEY (1976) o gênero *Solieria* foi descrito por J. Agardh em 1842, baseado em *Solieria chordalis*. Os aspectos vegetativos e reprodutivos foram descritos por Bornet em 1880. KYLIN (1932) incluiu o gênero *Solieria* como pertencente à família Solieraceae, sendo até hoje aceito pela maioria dos pesquisadores.

A alga marinha em estudo (Figura 1) é uma planta ereta, rósea-avermelhada, talo totalmente cilíndrico, de extremidades finas, agudas, consistência gelatinosa, ramificação subdicotômica e 6-16 cm de altura (WYNNE, TAYLOR, 1973).

Os exemplares desta alga podem ser encontradas nos seguintes locais no Ceará: Fortaleza: Barra do Ceará, Praia de Iracema, Barra do Cocó; Acaraú, Trairí, Paracuru, Caucaia, Aquiraz e Aracati (FERREIRA, PINHEIRO, 1966; PINHEIRO-VIEIRA, FERREIRA, 1968 como *Agardhiella tenera* (J. A. gardh) Smitz.

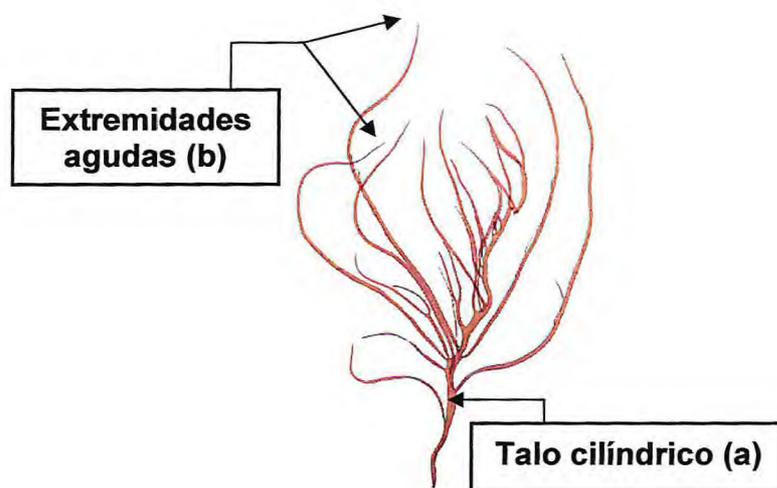


Figura 1. A alga marinha vermelha *Solieria filiformis* mostrando o talo cilíndrico (a) com as suas extremidades agudas (b).

Fonte: GEAMAR

1.2. Os polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados são polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares e carregados negativamente devido à presença de radicais sulfato. Estas moléculas são encontradas no tecido conjuntivo dos vertebrados (MATHEWS, 1975), estão presentes nos invertebrados (CÁSSARO, DIETRICH, 1977) e em grandes quantidades nas algas marinhas (PAINTER, 1983). Recentemente, foi detectada a presença do polissacarídeo sulfatado em graminhas marinhas (AQUINO et al., 2005).

Geralmente, os polissacarídeos sulfatados formam compostos de maior complexidade ligados covalentemente a uma proteína central sendo denominados de proteoglicanos (PGs) (Figura 2). Nos vertebrados, estes PGs possuem cadeias de polissacarídeos sulfatados denominados de glicosaminoglicanos (GAGs). Dentre os GAGs mais conhecidos estão os galactosaminoglicanos, com destaque para o condroitim sulfato (CS) e o dermatam sulfato (DS), e os glucosaminoglicanos, representados pela heparina e ácido hialurônico (KJELLÉN, LINDAHAL, 1991).

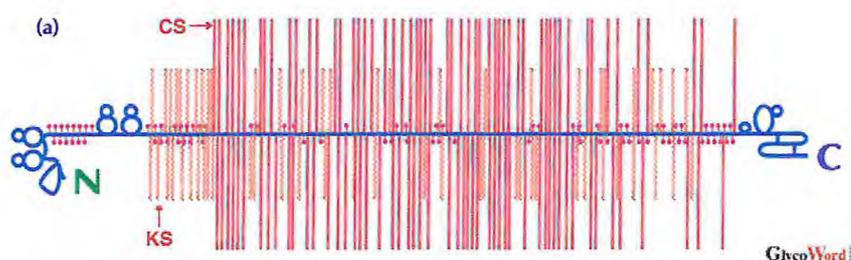


Figura 2. Estrutura de um proteoglicano (“agregan”) mostrando a proteína central em azul e as cadeias de condroitim sulfato(CS) e queratam sulfato (KS).

Fonte: GlycoWord

Nas algas marinhas os polissacarídeos sulfatados estão presentes como fucose sulfatada (fucoidam) nas algas pardas, como galactanas sulfatadas (carragenana e ágar) nas algas vermelhas (PAINTER, 1983) e, nas algas verdes os mais encontrados são as arabino-galactanas (PERCIVAL, McDOWEL, 1967).

As galactanas das algas vermelhas são polissacarídeos sulfatados que normalmente apresentam a seguinte estrutura: uma cadeia linear de unidades de galactose com resíduos alternados β -D-galactopiranosose e α -galactopiranosose com ligações do tipo 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4, respectivamente. Os resíduos de β -galactose sempre pertencem a série D-, enquanto os resíduos de α -galactose são D- nas carragenanas e L- nos agares. Grande parte ou todos os resíduos de α -galactose podem existir na forma de derivados 3,6-anidrido galactose. Vários grupos de hidroxila podem ser substituídos por éster sulfato, grupo metílico, ácido pirúvico acetal e, algumas vezes, por monossacarídeos (USOV, 1998).

1.3. Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados

Nos últimos anos, a busca por novos compostos aplicáveis nas ciências biomédicas e na biotecnologia provenientes dos organismos aquáticos vem se expandindo. Dentre estes compostos, pode-se destacar os polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante, antitrombótica, imunoestimulante, e as lectinas (proteínas hemaglutinantes e mitogênicas) extraídos de invertebrados e de algas (micro e macroalgas) (HIRSH, 1984; ARTHUR et al., 1985; BICK, FAREED, 1997; AINOUIZ et al., 1991).

FARIAS et al., (2000) isolou e caracterizou a estrutura de uma galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* que possui uma elevada atividade anticoagulante (semelhante a heparina) e, também, apresentou atividade antitrombótica quando testada em um modelo experimental de trombose venosa em ratos e não apresentou efeito hemorrágico quando comparada com a heparina (FARIAS et al., 2001).

Recentemente, foram incorporados os polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* em ração para larvas de tilápias, sendo observado um crescimento bastante diferenciado nas larvas que receberam determinada dose do polissacarídeo (FARIAS et al., 2004). Além disso, quando esses mesmos polissacarídeos sulfatados foram utilizados, numa determinada dose, em banhos de imersão em pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*, os mesmos apresentaram uma sobrevivência aumentada (FARIAS, com. pess.). Este efeito de aceleração do crescimento ou

uma melhoria na sobrevivência tem sido relatado como um efeito adicional da imunestimulação (SAKAI, 1999).

Além das atividades biológicas já mencionadas, os polissacarídeos sulfatados apresentam diversas outras, tais como antiviral, antiinflamatória, interação com fatores de crescimento, antiproliferativa, antimetastática, antiadesiva, podendo ainda inibir a fertilização (BOISSON-VIDAL et al., 1995).

A fucana sulfatada encontrada no ouriço-do-mar apresentou um papel fisiológico específico na indução de reação acrossômica. A reação acrossômica acontece quando o espermatozóide encontra o envoltório gelatinoso do óvulo. Enzimas hidrolíticas liberadas da vesícula acrossomal digerem a superfície do gel, enquanto proteínas adesivas ligam o espermatozóides à camada vitelínica, ocorrendo, então, a fusão das membranas plasmáticas do óvulo e espermatozóides, com a penetração do núcleo do último no óvulo (ALBERTS et al., 1989). ALVES et al., (1997) trabalhando com espécies de ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, *Arbacia lixula* e *Lytechinus variegatus* demonstraram que essa camada gelatinosa é indutora da reação acrossômica em espermatozóides da mesma espécie e não de espécies diferentes.

HAYASHI et al., (1996) isolaram o polissacarídeo sulfatado da microalga marinha *Spirulina platensis*, o “cálcio spirulan” que apresentou uma elevada atividade anti-viral quando testada no vírus da herpes (HSV-I) e no vírus da AIDS (HIV-I).

ANGULO et al., (2003), mostraram que o fucoidam, extraído da alga marinha parda *Fucus vesiculosus*, apresentou uma eficiente atividade citotóxica e miotóxica contra o veneno das serpentes *Bothrops asper*, *Cerrophidion godmani*, *Atropoides nummifer* e *Bothriechis schlegelii*.

A galactana sulfatada isolada da macroalga vermelha *Aghardhiella tenera* inibiu o efeito citopático do vírus da imunodeficiência tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2) em cultivo de células (WITVROUM, 1994).

ZHANG et al., (2003) mostrou que o polissacarídeo sulfatado da macroalga vermelha *Porphyra haitanesis* apresentou efeito inibitório da peroxidação lipídica em camundongos envelhecidos.

Segundo ZHOU et al., (2004) a alga marinha vermelha *Chondrus ocellatus* possui galactanas sulfatadas com atividade antitumoral e imunomodulatória. Esses polissacarídeos foram degradados em frações com

diferentes pesos moleculares, sendo que todas apresentaram atividade em maior ou menor grau.

As galactanas sulfatadas extraídas das macroalgas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata* apresentaram atividade antiviral contra o vírus do herpes simples tipos I e II. O mecanismo de ação dessa atividade está relacionado com a inibição da adsorção do vírus na célula-alvo. Além disso, essas galactanas foram eficientes em evitar a infecção viral do herpes tipo II a partir de uso tópico em vagina de roedores (TALARICO et al., 2004). Em outro trabalho de TALARICO et al., (2005) relataram que o polissacarídeo sulfatado dessas mesmas algas apresentou propriedade antiviral, inibindo a multiplicação do vírus da dengue (DENV-2) em células de macaco com concentração inibitória de 50% (IC₅₀).

CHOTIGEAT et al., (2004) relataram que a administração oral de fucoidam bruto, extraído da alga parda *Sargassum polycystum* reduziu a infecção do vírus causador da síndrome da mancha branca (WSSV) no camarão *Penaeus monodon* e também inibiu o crescimento das bactérias *Vibrio harveyi*, *Escherichia coli* (ambas gram negativas) e *Staphylococcus aureus* (gram positivas).

1.3.1. A atividade anticoagulante

1.3.1.1. A coagulação sangüínea

A cascata de coagulação sangüínea envolve uma série de reações que são dependentes da presença de cálcio podendo ocorrer em duas vias, a intrínseca, que é responsável pelo crescimento e manutenção da rede de fibrina, e a extrínseca, a qual depende de um fator tecidual (DAVIE et al., 1991). Este processo consiste na transformação do sangue líquido em coágulo pela conversão do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina estimulada por uma catálise enzimática.

A enzima trombina é necessária para a coagulação do sangue, colaborando tanto para a formação da rede de fibrina como para ativar outros cofatores importantes (OLSON, BJORK, 1992).

Os componentes, chamados de “fatores”, estão presentes no sangue na forma de precursores inativos que são ativados por proteólise promovendo a ativação de uma pequena quantidade de um certo fator que catalisa a formação de quantidades maiores do fator seguinte e assim sucessivamente, de modo que a cascata proporciona um mecanismo de amplificação (RANG et al., 1999).

Segundo pesquisas realizadas por BOURIN, LINDAHL (1993), a coagulação sangüínea pode ser bloqueada. Segundo esses autores, após a adição do proteoglicano trombomodulina, este se liga à trombina alterando suas atividades procoagulantes para anticoagulantes.

Nos polissacarídeos sulfatados, as atividades biológicas mais amplamente estudadas são a anticoagulante e a antitrombótica, que se expressam em vários representantes como na heparina, no sulfato de dextran, nas fucanas e galactanas sulfatadas (THOMAS et al., 1989; COLLIEC et al., 1991; NISHINO et al., 1991; NISHINO, NAGUMO, 1992).

A heparina é um polímero da família dos glicosaminoglicanos sulfatados que foi descoberto em 1916. Este polissacarídeo apresenta alta atividade anticoagulante e é extraído de pulmão bovino ou de intestino de suínos, sendo a heparina de baixo peso molecular as mais utilizadas na clínica médica (RANG et al., 2001).

A busca por novas substâncias anticoagulantes e antitrombóticas é justificada, principalmente, pelos efeitos adversos da heparina como episódios de sangramento e queda na contagem de plaquetas (THOMAS, 1997).

Os invertebrados possuem polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante, podendo ser encontrados em moluscos, equinodermas e ascídias, estes últimos possuem moléculas de sulfato de dermatan. Outro polissacarídeo sulfatado, o sulfato de condroitina fucosilado, isolado do pepino do mar *Ludwigothuria grisea* também possui atividade anticoagulante e antitrombótica (BURSON et al., 1956; MOURÃO et al., 1996; PAVÃO et al., 1998).

BURSON et al., (1956) isolaram dos moluscos *Mactrus pussula* e *Cyprinia islandica* uma substância denominada de “mactina”, que apresentou atividade anticoagulante, sendo estruturalmente semelhante a heparina.

DELLIAS et al., (2004) compararam a composição e atividade anticoagulante do dermatam sulfato purificado da pele de três espécies de raias marinhas da costa do Brasil e uma espécie de água doce com o dermatam dos mamíferos. Com relação ao teste anticoagulante, concluíram que o dermatam sulfato da *Dasyatis americana* tem alta atividade anticoagulante e o da *Dasyatis gutatta* mostrou ação similar com o dermatam dos mamíferos. Em contraste, os dermatans da *Aetobatus narinari* e *Potamotrygon motoro* não apresentaram atividade anticoagulante.

A primeira descrição da atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de alga marinha foi feita por CHARGAFF et al., (1936), relatando o efeito anticoagulante de galactanas sulfatadas extraídas da espécie *Iridaea laminarioides*.

HAWKINS, LEONARD (1962) demonstraram a atividade anticoagulante “in vitro” da carragenana, extraída da alga vermelha *Chondrus crispus*, utilizando plasma humano e de cachorro.

O polissacarídeo sulfatado encontrado na alga verde *Codium cylindricum* mostrou uma atividade anticoagulante similar a heparina (MATSUBARA et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi extrair, purificar e avaliar a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta do material

Os exemplares da macroalga vermelha *Solieria filiformis* foram coletados na praia do Pacheco-Caucaia-CE, em condições de maré baixa. As algas foram colocadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório, onde as mesmas foram lavadas com água corrente para retirar às epífitas e outros organismos. Em seguida, as algas foram secas ao sol e, depois cortadas em pedaços pequenos.

2.2. Extração de polissacarídeos sulfatados

Para a extração dos polissacarídeos sulfatados foram utilizadas duas metodologias, as quais serão descritas a seguir:

2.2.1. Método I

Inicialmente, o material (2g de alga seca) foi submetido a uma hidratação com 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 + EDTA 5 mM + cisteína 5 mM. Em seguida, foram adicionados 6,8 mL de uma solução de papaína bruta (30mg/mL), sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, a mistura foi filtrada e centrifugada (15.000 rpm; 4 °C) para separar o resíduo do sobrenadante. Em seguida, ao sobrenadante, adicionou 6,4 mL de CPC 10% (cloreto de cetilpiridínio) para precipitação dos polissacarídeos sulfatados, por 24 horas à temperatura ambiente. O resíduo obtido da filtração foi incubado novamente, sofrendo o mesmo procedimento descrito anteriormente, com o objetivo de otimizar o rendimento. Logo após a precipitação, o “pellet” foi lavado com 200 mL de CPC 0,05%, dissolvido em 69,6 mL de NaCl 2M: etanol absoluto (100:15; v/v) e submetido a uma nova precipitação com adição de mais 122 mL de etanol absoluto, por 24 horas à 4°C. Em seguida, a solução foi centrifugada e o precipitado foi submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol 80% e uma

com 120 mL de etanol absoluto, sendo então levado à estufa a 60°C para secagem (Figura 3).

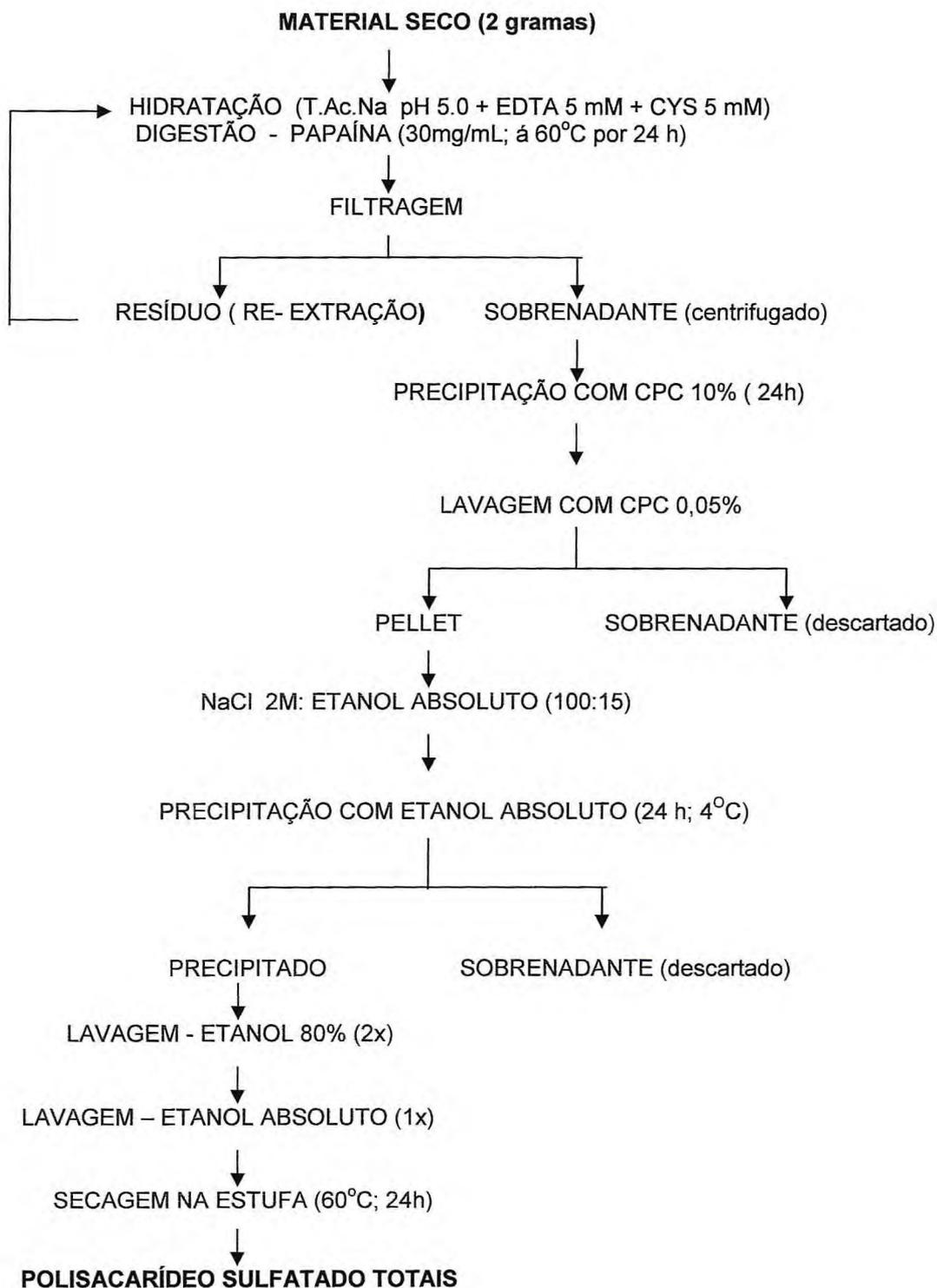


Figura 3. Fluxograma mostrando os procedimentos realizados no método de extração I.

2.2.2. Método II

O material (2 g de alga seca) foi submetido a uma hidratação com 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 + EDTA 5 mM + cisteína 5 mM. Em seguida, foram adicionados 6,8 mL de uma solução de papaína bruta (30mg/mL) e a mistura foi incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após este período, a solução foi filtrada e centrifugada (13.000 rpm; 4 °C), sendo separado o resíduo do sobrenadante. O resíduo obtido neste método também foi incubado novamente, a fim de otimizar o rendimento. Ao sobrenadante foram adicionados 3 vezes o volumes de etanol absoluto para precipitar os polissacarídeos sulfatados. Essa nova solução permaneceu em repouso, à temperatura ambiente, por 24 horas. Em seguida, esta solução foi centrifugada e o “pellet” foi submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol 80% e uma com 120 mL de etanol absoluto, sendo então levado à estufa a 60°C por 24 h para secagem do material (Figura 4).

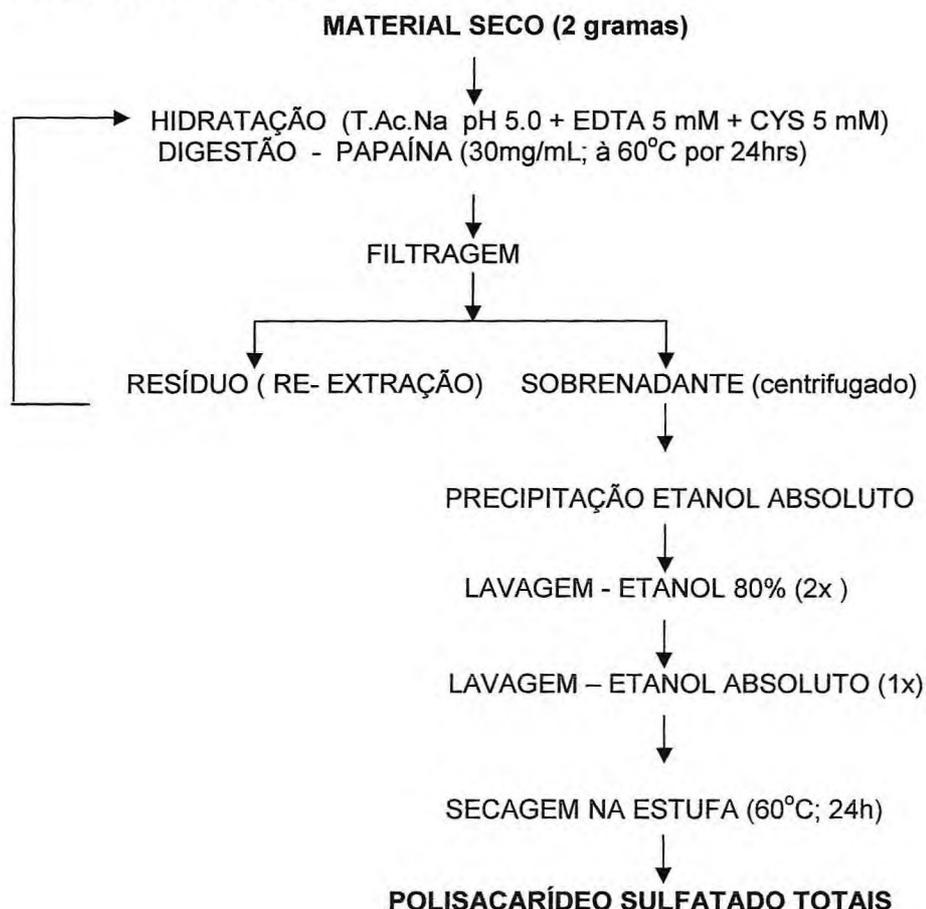


Figura 4. Fluxograma mostrando os procedimentos realizados no método de extração II.

2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados brutos em coluna de troca iônica

Os polissacarídeos sulfatados brutos, obtidos de ambos os métodos de extração, foram fracionados em coluna de troca-iônica de DEAE-celulose acoplada a um coletor de frações. O fluxo da coluna foi mantida em 1mL/minuto, sendo coletadas frações de 1 mL. A coluna (6,5 cm × 1,5 cm) foi equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 + EDTA 5 mM + cisteína 5 mM. Uma amostra de 1 mL da solução com polissacarídeo sulfatado bruto (1 mg/mL) foi aplicado no topo do gel. Em seguida, a coluna foi eluída com soluções de concentrações crescentes de NaCl (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 M), preparadas no mesmo tampão de equilíbrio. Os polissacarídeos sulfatados foram monitorados através da reação metacromática.

2.4. Atividade metacromática nas frações obtidas no fracionamento

Para determinar a atividade metacromática, uma amostra de 200 µL da solução obtida no fracionamento, foi adicionada a 1 mL de DMB (dimetil-azul-dimetileno), Em seguida foi levada ao espectrofotômetro para a leitura em 525nm.

2.5. Detecção da presença de açúcar nas frações obtidas no fracionamento

A metodologia utilizada para detectar a presença do açúcar nas frações foi realizada de acordo com teste de DUBOIS (DUBOIS et al., 1956). Uma amostra de 50 µL da solução contendo polissacarídeo sulfatado, obtido no fracionamento, foi adicionado a 350 µL de água destilada, 20 µL de fenol redestilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo essa mistura incubada por 30 minutos. Após esse período, a mistura foi levada ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância em 490 nm.

2.6. Atividade anticoagulante nas frações obtidas no fracionamento

A avaliação da atividade anticoagulante, segundo metodologia descrita por ANDERSSON et al., (1976), foi determinada em um coagulômetro (Drake, modelo Quick-timer), utilizando plasma humano citratado obtido de cinco doadores diferentes.

Primeiramente, as amostras de sangue humano foram reunidas e centrifugadas (2.500 rpm; 15 minutos) para a obtenção de um plasma humano pobre em plaquetas.

Para a realização do teste do APTT (tempo de ativação parcial da tromboplastina), inicialmente, misturou-se 50 μ L de plasma humano com 50 μ L de cefalina ativada e 5 μ L de solução de polissacarídeos sulfatados, oriundo do fracionamento, foram incubados a 37°C por 3 minutos. Após a incubação, foram adicionados 50 μ L de cloreto de cálcio 0,025 M à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os testes foram realizados em duplicata, sendo o tempo de coagulação determinado automaticamente pelo coagulômetro.

2.7. Determinação da condutividade nas frações obtidas no fracionamento

Na determinação da condutividade nas frações, obtida no fracionamento, utilizou-se 120 μ L da amostra com 12 mL de água destilada, em seguida, fez-se a leitura da mistura em um condutivímetro de marca Analyser. O mesmo procedimento foi utilizado para as soluções padrões (0,5; 0,9 e 2,0 M de NaCl) e por comparação, determinou-se as concentrações de NaCl reais nas frações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Extração de polissacarídeos sulfatados

No processo de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Solieria filiformis*, foram realizadas 3 extrações, utilizando cada um dos métodos citados anteriormente. O método I apresentou um rendimento parcial bruto de 480 mg na 1ª incubação, 273 mg na 2ª incubação e 115 mg na 3ª incubação. Com relação ao método II, foi obtido, na 1ª incubação, um rendimento bruto de 504 mg, sendo 322 mg na 2ª incubação e 110 mg na 3ª incubação (Figura 5).

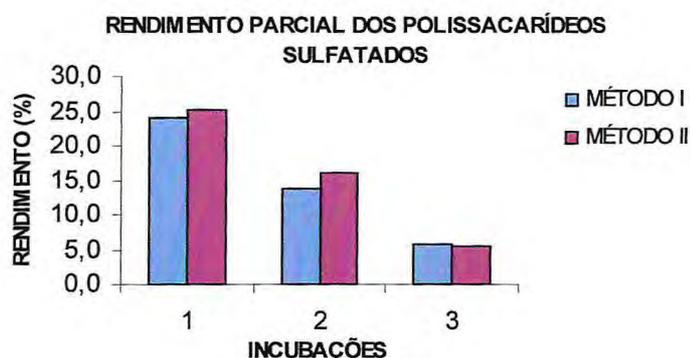


Figura 5. Rendimentos parciais das extrações de polissacarídeos sulfatados da alga *Solieria filiformis* obtidos pelos dois métodos de extração.

Os resultados mostraram que o rendimento da 1ª incubação, realizada pelo método II, mostrou-se ligeiramente superior quando comparado com o obtido na mesma incubação do método I. Este fato se repetiu durante a 2ª incubação dos dois métodos. Porém, na 3ª incubação os rendimentos obtidos pelos dois métodos foram praticamente iguais.

O rendimento total obtido pelo método I foi de 43,4%, considerando as 3 incubações, enquanto que o obtido pelo método II foi de 46,8% (Figura 6).



Figura 6. Rendimento total das extrações de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* obtidos pelos métodos I e II.

3.2- Fracionamento em DEAE-celulose

Os polissacarídeos sulfatados brutos extraídos pelos métodos I e II foram fracionados em coluna de troca-iônica DEAE-celulose. Com relação ao método I podemos observar que, na 1ª incubação, os polissacarídeos sulfatados foram eluídos com soluções de NaCl nas concentrações de 1,2; 1,4 e 1,6 M (Figura 7). A fração eluída com 1,6 M de NaCl apresentou uma maior atividade metacromática, seguida das frações eluídas com 1,2 e 1,4 M, respectivamente.

Com relação ao teor de açúcar, a fração eluída com 1,4 M de NaCl apresentou o maior valor, enquanto que a menor concentração de açúcar foi observada na fração eluída com 1,2 M de NaCl (Figura 7). Analisando a relação entre metacromasia e teor de açúcar, podemos observar que, nas frações eluídas com 1,4 e 1,6 M de NaCl, as concentrações de açúcar são muito superiores do que a atividade metacromática, enquanto que, na fração eluída com 1,2 M esta relação é praticamente a mesma.

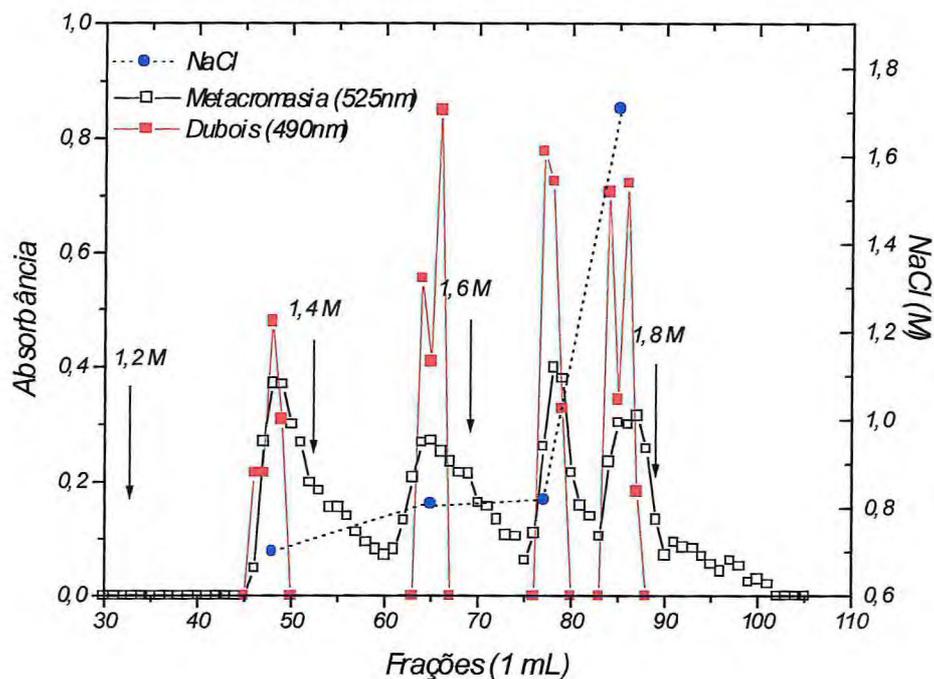


Figura 7. Metacromasia, teor de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 1ª incubação pelo método I de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.

Com relação à 2ª incubação do método I, podemos observar que, além das frações eluídas com 1,2; 1,4 e 1,6 M de NaCl, foram eluídas mais duas frações, uma com 0,9 M e outra com 1,8 M de NaCl (Figura 8). A fração eluída com 1,4 M de NaCl apresentou a maior atividade metacromática, seguida das frações eluídas com 1,2; 1,8; 1,6 e 0,9 M de sal. Na determinação do teor de açúcar, a fração eluída com 0,9 M de NaCl foi a que apresentou o menor valor, enquanto que, na fração eluída com 1,2 M, esse valor foi o mais significativo (Figura 10). A relação entre metacromasia e teor de açúcar foi praticamente a mesma nas frações eluídas com 0,9, 1,4 e 1,8 M de NaCl, enquanto que nas demais frações o teor de açúcar foi bastante superior à atividade metacromática.

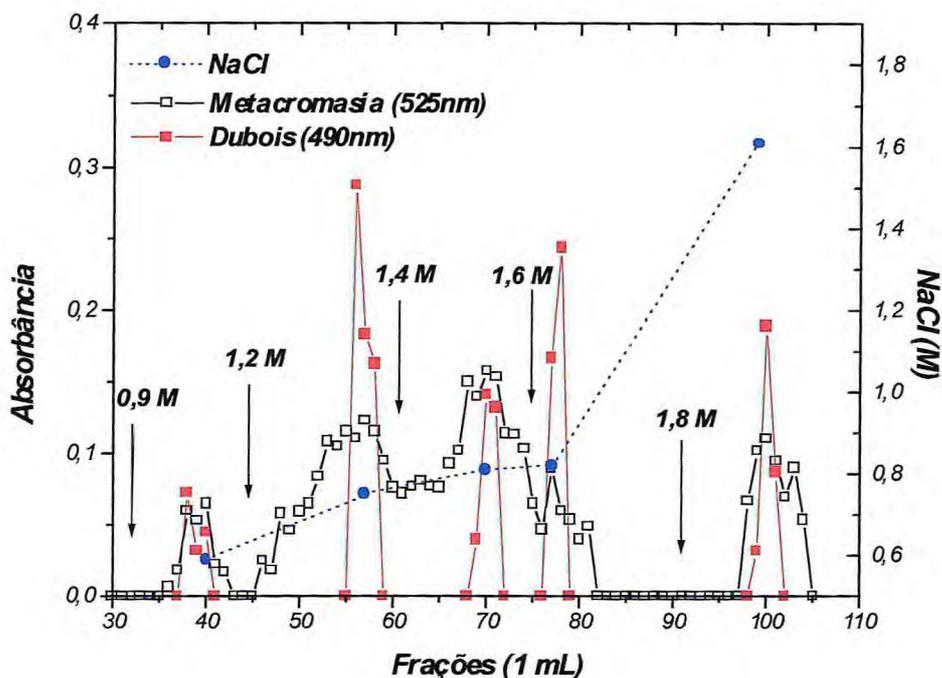


Figura 8. Metacromasia, teor de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 2^a incubação pelo método I de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.

A 3^a incubação do método I revelou um perfil metacromático bastante semelhante ao obtido na 2^a incubação, exceto pela ausência de uma fração eluída com 0,9 M de NaCl. Além disso, nessa incubação, a fração eluída com 1,8 M de NaCl foi a mais metacromática (Figura 9). Com relação ao teste de Dubois, nas frações eluídas com 1,2 e 1,6 M de NaCl, o teor de açúcar foi superior à metacromasia, sendo que essa diferença foi maior na fração eluída com 1,6 M de sal. Já, nas frações eluídas com 1,4 e 1,8 M de NaCl, a relação entre metacromasia e teor de açúcar foi praticamente a mesma (Figura 9).

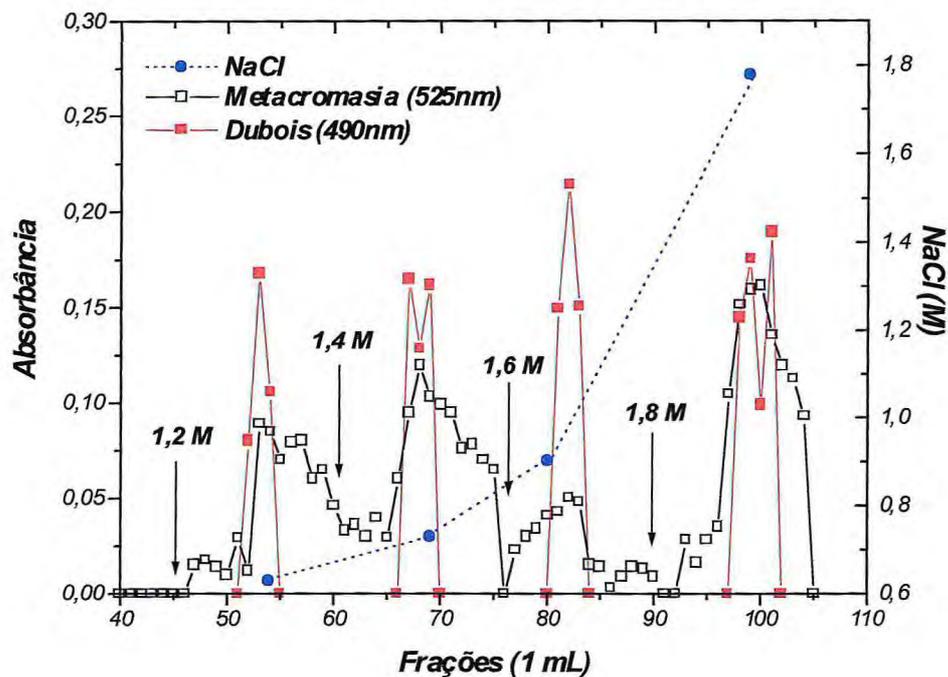


Figura 9. Metacromasia, teor de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 3ª incubação pelo método I de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.

A Figura 10 mostra o perfil metacromático e o teor de açúcar dos polissacarídeos sulfatados extraídos na 1ª incubação do método II. Nesta cromatografia, foram eluídas três frações com atividade metacromática. Pode-se observar que a fração eluída com 1,4 M de NaCl, apresentou a maior atividade metacromática, seguida das eluídas com 1,2 e 1,6 M de NaCl. No teste de Dubois, em todas as frações, o teor de açúcar foi menor do que a metacromasia (Figura 10), mostrando uma tendência contrária à 1ª incubação do método I, no qual o teor de açúcar foi sempre superior a metacromasia (Figura 7).

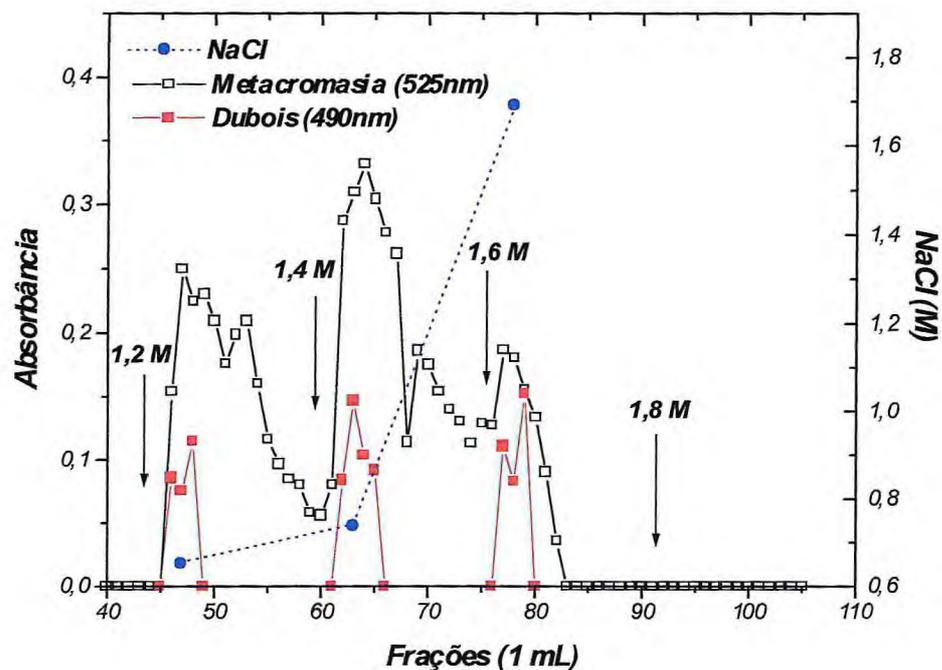


Figura 10. Metacromasia, teor de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 1ª incubação pelo método II de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.

Na 2ª incubação do método II, (Figura 12) as frações foram eluídas com soluções de concentrações 0,7; 0,9; 1,2; 1,6 e 1,8 M de NaCl. A fração mais metacromática foi eluída com concentração 1,8 M de sal. Nesta incubação surgiu uma nova fração eluída com 0,7 M de sal e nenhuma fração foi eluída com 1,4 M de NaCl. O teste de Dubois revelou que, nas frações eluídas com 0,7; 0,9 e 1,2 M de sal, os teores de açúcar foram maiores do que a metacromasia, sendo maior na fração eluída com 1,2 M de sal. Por outro lado, nas frações eluídas com 1,6 e 1,8 M de NaCl os teores de açúcar foram menores do que a metacromasia (Figura 12).

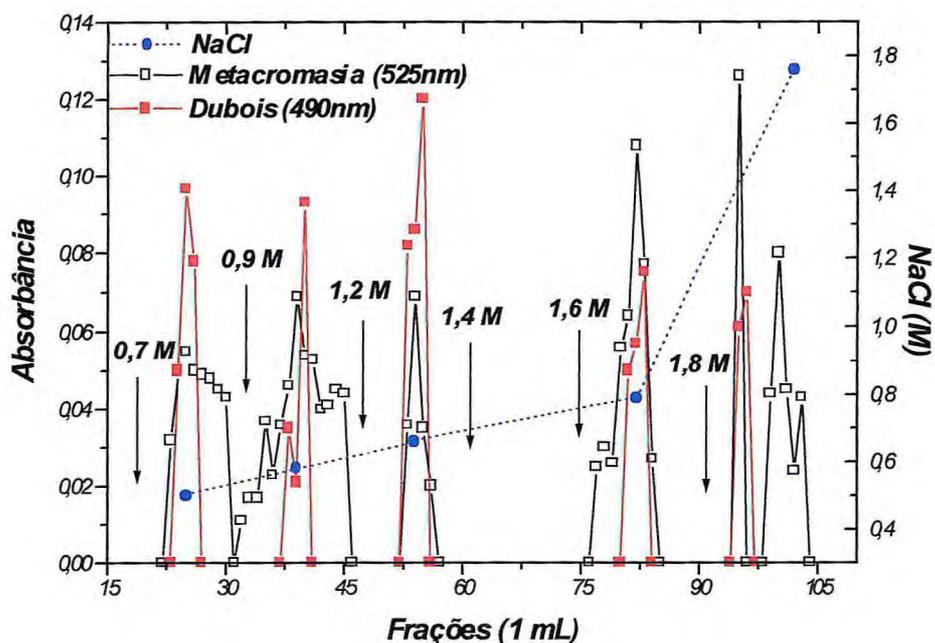


Figura 11. Metacromasia, teor de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 2ª incubação pelo método II de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.

Com relação à 3ª incubação do método II, as frações foram eluídas nas concentrações de 1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 M de sal (Figura 14). Semelhante ao observado na 3ª incubação do método I de extração, a fração mais metacromática foi eluída com 1,8 M de NaCl, seguida das frações eluídas com 1,4; 1,2 e 1,6 M de NaCl. No teste de Dubois, nas frações eluídas com 1,2 e 1,8 M de sal, o teor de açúcar foi menor do que a metacromasia e, somente na fração eluída com 1,6 M, o teor de açúcar foi superior à metacromasia. Já a fração eluída com 1,4 M de NaCl, a relação entre metacromasia e teor de açúcar foi bastante semelhante (Figura 14).

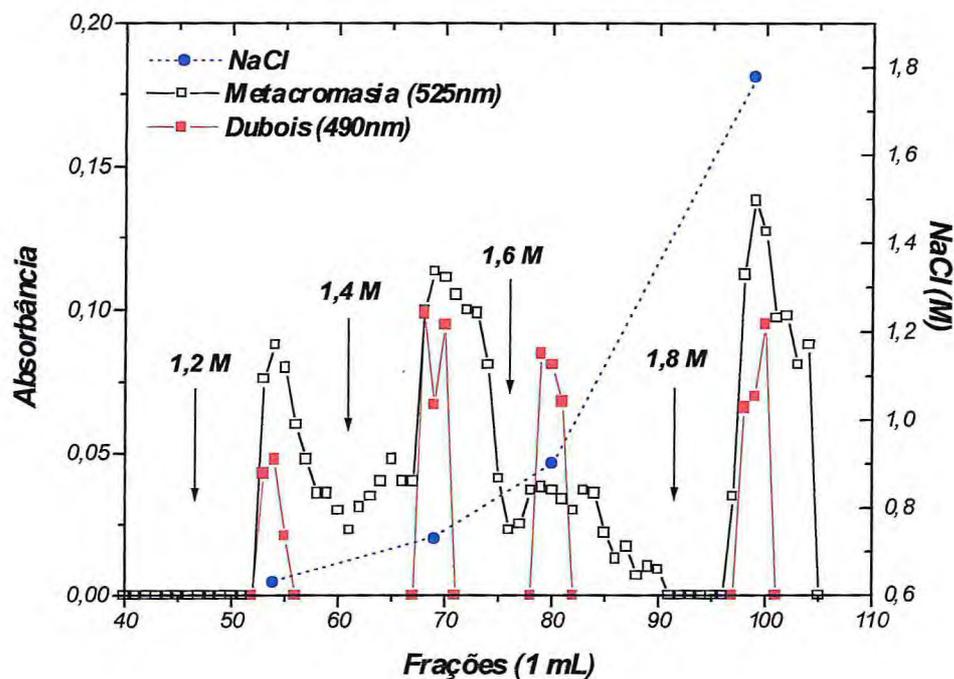


Figura 12. Metacromasia, teor de açúcar e concentração de NaCl nas frações obtidas na 3^a incubação pelo método II de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.

De uma maneira geral, pode-se afirmar que a atividade metacromática nas frações decresceu da 1^a para a 3^a incubação em ambos os métodos de extrações. Nas três incubações do método I, nenhuma fração foi eluída com 0,5 e 0,7 M de NaCl, no entanto, no método II de extração, foi observada uma fração eluída com 0,7 M de NaCl (2^a incubação). Não foi observada nenhuma fração eluída com 1,4 M de sal na 2^a incubação (M II). A fração eluída com 1,8 M de NaCl cresceu a partir da 2^a incubação, ficando superior as demais frações na 3^a incubação no método I e II.

3.3. Atividade anticoagulante (APTT) das frações obtidas na coluna de troca-iônica.

A Tabela 1 apresenta a atividade anticoagulante das frações obtidas na coluna de troca-iônica. Podemos observar que a atividade anticoagulante das frações eluídas nas primeiras incubações de ambos os métodos de extração foram as que apresentaram as maiores atividades. As frações eluídas com 1,2 M (1ª incubação, M I) e 1,4 M de NaCl (1ª incubação, M II) apresentaram um tempo de coagulação 2,54 e 2,23 vezes superior ao tempo controle (sem polissacarídeo sulfatado), sendo essas as frações com atividades anticoagulantes mais significativas.

Tabela.1 Atividade anticoagulante das frações obtidas no fracionamento dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Solieria filiformis*, utilizando dois métodos de extração (M I e M II).

FRAÇÕES	1ª INCUBAÇÃO TEMPO (S)		2ª INCUBAÇÃO TEMPO (S)		3ª INCUBAÇÃO TEMPO (S)	
	M I	M II	M I	M II	M I	M II
1,2 M	97,7	71,5	41,3	44,5	40,6	44,2
1,4M	78,3	85,7	48,9	*	45,0	47,0
1,6 M	82,2	78,25	46,0	50,7	40,8	44,0
1,8 M	74,7	*	58,4	52,3	47,5	44,2
CONTROLE	38,4 s					
HEPARINA	1µL da amostra > 240 s					

*Não foi realizado teste do APTT.

Na 2ª incubação de ambos os métodos, as frações eluídas com 1,8 M de sal apresentaram maior atividade, sendo 1,52 vezes superior ao tempo controle na fração eluída pelo método I e 1,36 vezes superior na eluída pelo método II.

Na 3ª incubação de ambos os métodos, praticamente não houve diferença no tempo de coagulação entre as frações obtidas, sendo a atividade ligeiramente superior nas frações eluídas com 1,8 M (M I) e 1,4 M de NaCl (M II).

De uma maneira geral, as frações que apresentaram as maiores atividades anticoagulantes foram as mais metacromáticas ou aquelas em que a relação entre o teor de açúcar e a atividade metacromática foi mais semelhante. As frações que apresentaram baixa metacromasia e aquelas em que o teor de açúcar foi muito superior à atividade metacromática foram as que apresentaram as menores atividades anticoagulantes.

Diferentes procedimentos são utilizados para extrair polissacarídeos sulfatados. O rendimento varia dependendo da metodologia adotada e das espécies de organismos utilizados, o que dificulta qualquer comparação.

MELO et al., (2002) utilizaram o método I para extrair o polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* e obteve rendimento de 21,4% a partir de 100g de alga seca.

FARIAS (2000) ao extrair os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, através do método I de extração, obteve rendimento de 4% a partir de 5g de alga seca.

RODRIGUES (2004) extraiu polissacarídeos sulfatados da alga verde *Caulerpa racemosa* utilizando o método I e II de extração e obteve rendimentos totais, considerando todas as incubações, de 13% e 15% respectivamente.

CHOTIGEAT et al., (2004) extraíram, a partir de 100g de alga seca, o polissacarídeo sulfatado da alga parda *Sargassum polycystum* utilizando 0,1 N de HCl à 95 °C por 12h, onde o extrato bruto foi dializado e liofilizado. O rendimento bruto obtido foi de $22,3 \pm 4,51\%$.

A extração dos polissacarídeos sulfatados brutos de algas marinhas possui bom rendimento, porém a alga marinha *Solieria filiformis* apresentou rendimento excelente comparada com outras espécies de algas marinhas relatadas neste trabalho.

O método de extração II apresentou um maior rendimento dos polissacarídeos brutos, sendo também mais rápido e econômico. Porém o método de extração I foi mais eficiente em obter polissacarídeos sulfatados do que o método II. Comparando as Figuras 7 e 10 (ambas de 1^a incubação), as frações obtidas no fracionamento através do método de extração I apresentou uma maior atividade metacromática e, também, foi detectado uma maior presença de açúcar.

Os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* apresentaram baixa atividade anticoagulante. Por outro lado, uma baixa atividade anticoagulante não implica em ausência de outras atividades biológicas, como no caso do polissacarídeo sulfatado extraído da microalga *Spirulina platensis* que possui uma baixa atividade anticoagulante e uma elevada atividade antivira (HAYASHI, 1996).

4. CONCLUSÕES

Após a realização desse trabalho, as seguintes conclusões podem ser apontadas:

- 1) O rendimento total dos polissacarídeos extraídos pelo método II, considerando todas as incubações, foi maior (46,8%) do que o obtido pelo método I (43,4%);
- 2) Tanto no método I como no método II de extração, o rendimento da 1ª incubação foi bem superior aos demais incubações e também foram obtidas frações com maior atividade anticoagulantes;
- 3) A coluna de troca iônica DEAE-celulose foi bastante eficiente para separar as diferentes frações de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*;
- 4) As frações eluídas com 1,2 M de NaCl na 1ª incubação (M I) e com 1,4 M de NaCl na 1ª incubação (M II) foram as que obtiveram maior atividade anticoagulante.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H. Screening of Brazilian marine algae for haemagglutinins. **Botanica Marina**, Berlin, v. 34, n. 3, p. 211-214, May 1991.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Molecular Biology of The Cell**, 2^a ed., p. 868-676, Garland Publishing, 1989.

ALVES, A.P.; MULLOY B.; DINIZ, J.A.; MOURÃO, P.A.S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrossomal reaction in sperms of sea urchins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, n. 11, p. 6965-6971, Mar 1997.

ANDERSSON, L.O.; BARROWCLIFFE, T.W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E.A.; SIMS, G.E.C. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel filtration. **Thrombosis Research**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 575-580, Dec 1976.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A(2). **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 66, n. 10, p. 1993-2000, Nov 2003.

AQUINO, R.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R.; MOURÃO, P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms. Evolutionary implications. **Glycobiology**, Cary, v. 15, n. 1, p. 11-20, Jan 2005.

ARTHUR, C.K.; ISBISTER, J.P.; ASPERY, E.M. The heparin induced thrombosis-thrombocytopenia syndrome (HITTS): a review. **Pathology**, Oxfordshire, v. 17, n. 1, p. 82-86, 1985.

BICK, R.L.; FAREED, J. Current status of thrombosis: A multidisciplinary medical issue and major American health problem beyond the year 2000. **Clinical Applied Thrombosis Hemostasis**, Philadelphia, v. 3, Suppl. 1, p. S1, 1997.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A.M.; DE AGOSTINE, A.; JOZEFONVICZ, J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the Future**, Barcelona, v. 20, n. 12, p. 1237-1249, 1995.

BOLD, H.C.; WYNNE, M.J. Introduction to the algae. Structure and Reproduction. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 706 p, 1978.

BOURIN, M.C.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochemical Journal**, London, v. 289, p. 313-330, Part 2, Jan 1993.

BURSON Jr. S.L.; FAHRENBACH, M.J.; FROMMHAGEN, B.A.; RICCARDI, R.A.; BROWN, J.A.; BROCKMAN, H.V.; LOWRY, E.L.R.; STOKSTAD, J. Isolation and purification of mactins, heparin-like anticoagulants from Mollusca. **Journal of American Chemical Society**, Washington v. 78, n. 22, p. 5874-5878, 1956.

CÁSSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.

CHARGAFF E.; BANCROFT F.W.; STANLEY-BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 115, p. 155-161, 1936.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, n. 1-4, p. 23-30, Apr 2004.

COLLIEC, S.; FISHER, A.M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C.; DURANT, P.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thrombosis Research**, Oxford, v. 64, n. 2, p. 143-154, Oct 1991.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, Washington, v. 30, n. 43, p. 10363-10370, Oct 1991.

DELLIAS, J.M.M.; ONOFRE, G.R.; WERNECK, C.C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M.; MELO, F.R.; FARIAS, W.R.L.; SILVA, L.C.F. Structural composition and differential anticoagulant activities of dermatan sulfates from the skin of four species of rays, *Dasyatis americana*, *Dasyatis gutatta*, *Aetobatus narinari* and *Potamotrygon motoro*. **Bichimie**, v. 86, p. 677-683, Sep-Oct 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FARIAS, W.R.L. **Estrutura e Atividades Anticoagulante e antitrombótica de Galactanas Sulfatadas da Alga Vermelha *Botryocladia occidentalis***. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 102 pp, 2000.

FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A.; MOURÃO, P.A.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 86, n. 6, p. 1540-1546, Dec 2001.

FARIAS, W.R.L.; REBOUÇAS, H.J.; TORRES, V.M.; RODRIGUES, J.A.G.; PONTES, G.C.; SILVA, F.H.O. Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. **Scientia Agricola**, 2004.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans: Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, Sep 2000.

FERREIRA, M. M.; PINHEIRO, F.C. Primeira contribuição ao inventário das algas marinhas bentônicas do nordeste brasileiro. *Arq. Estaç. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará*, v. 6, n.1, p. 59-66, 1966.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulam, isolated from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **Aids Research and Human Retroviruses**, New York, v. 12, n. 15, pp.1463-1471, Out 1996.

HAWKINS, W.W., LEONARD, V.G. Antipeptic and antitrombic properties of carrageenin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, ST Louis, v. 60, n. 4, p. 641-647, 1962.

HIRSH, J. Heparin induced bleeding. **Nouvelle Revue Francaise D Hematologie**, New York, v. 26, n. 4, p. 261-266, 1984.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: Structures and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 60, p. 443-475, 1991.

KYLIN, H. Die Florideenordnung Gigartinales. *Acta. Univ. Lund*, v.28, n. 8, p.1-88, 1932.

MATHEWS, M.B. Polyanionic proteoglycans. IN: *Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution*. KLEINZELLER; SPRINGER, G.F.; WITMANN, H.G. eds. Springer-Verlaq, Berlim, pp. 93-125, 1975.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, n. 5, p. 395-399, Jun 2001.

MELO, M.R.S.; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P.; PAULA, R.C.M. Isolation and Characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 49, n. 4, 491-498, Sep 2002.

MIN-THEIN, U.; WOMERSLEY, H.B.S. Studies on southern Australian taxa of Solieraceae, Rhabdoniaceae and Rhodophyllidaceae (Rhodophyta). **Australian Journal of Botany**, Collingwood victoria, v. 24, n. 1, p. 1-166, 1976.

MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S.; PAVÃO, M.S.G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D.M.; MOWINCKEL, M.C.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its high antithrombotic action. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, n. 39, p. 23973-23984, Sep 1996.

NISHINO, T.; NAGUMO, T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 229, n. 2, p. 355-362, May 1992.

NISHINO, T.; NAGUMO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Studies on polysaccharides from *Ecklonia kurome*. 2. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 211, n. 1, p. 77-90, Apr 1991.

NORRIS, J.N.; KUGRENS, P. Marine Rhodophyceae: Introduction and Bibliography. In: ROSOWSKI, J.R.; PARKER, B.C. Selected Papers in Phycology, 2. Lawrence, Phycological Society of America, p. 663-670, 1982.

OLIVEIRA FILHO, E.C. **Algas marinhas bentônicas do Brasil**. S. Paulo, Tese de Livre Docência em Ficologia, Univ. São Paulo, p. 1-400, 1977.

OLSON, T.J.; BJORK, I. Regulation of thrombin by antithrombin and heparin cofactor II. **IN: Thrombin: Structure and Function**. Lawrence J. Berliner (ed). Plenum Press, New York, p. 159-217, 1992.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. **IN: The Polysaccharides**, Academic Press, New York, vol. II, 195p, 1983.

PAVÃO, M.S.G.; AIELLO, K.R.M.; WERNECK, C.C.; SILVA, L.C.F.; VALENTE, A.P.; MULLOY, B.; COLWELL, N.S.; TOLLEFSEN, D.M.; MOURÃO, P.A.S. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 43, p. 27848-27857, Oct 1998.

PERCIVAL, E.; MACDOWELL, R.H. **Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides**, Academic Press, ed., New York, 1967.

PINHEIRO-VIEIRA, F.; FERREIRA, M.M. Algas marinhas de interesse industrial para o nordeste brasileiro. **Bol. Estaç. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará**, n. 20, p. 1-9, 1968.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Quarta edição Hemostasia e trombose, v.17, p. 255-269, 1999.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. Quarta edição, 703p, 2001.

RODRIGUES, J.A.G. Extração, fracionamento purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (CHLOROPHYTA, CAULERPALES), Jul 2004.

TALARICO, L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARÍA, P.C.S.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M.E.R.; DAMONTE, E.B. The antiviral activity of sulfated polysaccharide against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, v. 66, p. 103-110, Jun 2005.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonema crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 34, n. 1-2, p. 63-71, Apr 2004.

THOMAS, D.P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding? : **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 78, n. 6, p. 1422-1425, Dec 1997.

THOMAS, D.P.; MERTON, R.E.; GRAY, E.; BARROWCLIFFE, T.W. The relative antithrombotic effectiveness of heparin, a low-molecular weight heparin and a pentasaccharide fragment in a animal model. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 204-207, Apr 1989.

USOV, A.I. Strutural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups, **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, n. 3 p. 301-308, Jul 1998.

ZHANG, Q.; LI, N.; ZHOU, G.; LU, X.; XU, Z.; LI, Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) inaging mice. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 151-155, 2003.

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

WYNNE, M.J.; TAYLOR, W.R. Status of *Agardhiella tenera* and *Agardhiella baileyi* (Rhodophyta, Gigartinales). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 43, n. 1-2, p. 93-107, 1973.

WITVROUW, M.; ESTE, J.A.; MATEU M.Q.; REYMEN, D.; ANDREI, G.; SNOECK, R.; IKEDA, S.; PAUWELS, R.; BIANCHINI, N.V.; DESMYTER, J.; DECLERCQ, E.; Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against Human Immunodeficiency Virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, Oxon, v. 5, n. 5, p. 297-303. Sep 1994.