



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

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE  
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA PARDA  
*Lobophora variegata***

**DANIEL BARROSO DE ALENCAR**

---

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

---

**FORTALEZA - CEARÁ – BRASIL  
JULHO/2007**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof Wladimir Ronald Lobo Farias, D.Sc.  
Orientador**

---

**Prof<sup>a</sup> Silvana Saker-Sampaio, Ph.D.  
Membro**

---

**Eng. Pesca José Ariévilu Gurgel Rodrigues, M.Sc.  
Membro**

**VISTO**

---

**Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc.  
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca**

---

**Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D. Sc.  
Coordenador 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)

---

A353e Alencar, Daniel Barroso de.

Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da Alga Marinha Parda *Lobophora variegata* / Daniel Barroso de Alencar. – 2007.  
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

Coorientação: Profa. Dra. Silvana Saker-Sampaio.

1. Alga marinha parda - Brasil, Nordeste. 2. Alga marinha parda - Beneficiamento. 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

---

Aos meus pais, Gilberto e Angela que com muito carinho, amor e luta promoveram a minha educação e formação como pessoa e pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu estimado e querido irmão, pela amizade, apoio e por estar sempre ao meu lado sem me deixar desanimar.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor onipotente, pela vida, pela persistência, pela força e por sempre estar ao meu lado, direcionando o caminho que devo percorrer.

Aos meus pais, Gilberto Monteiro de Alencar e Angela Maria Barroso de Alencar, ao meu irmão Gilberto Monteiro de Alencar e a minha cunhada Livia de Paulo Pereira de Alencar, pelo apoio, amor, incentivo e por sempre estarem comigo nos momentos mais felizes da minha vida.

Ao meu orientador Professor Wladimir Ronald Lobo Farias pela orientação, apoio e amizade em todos os momentos.

Um agradecimento especial à professora Silvana Saker-Sampaio e ao professor Alexandre Sampaio, pelo companheirismo, amizade, pelo exemplo de dedicação à profissão escolhida e pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao Engenheiro de Pesca José Ariévilto Gurgel Rodrigues pela amizade e pelas valiosas sugestões no intuito de melhorar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por ter concedido bolsa para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica Marinha (BIOMAR) do Departamento de Engenharia de Pesca, os Engenheiros de Pesca Valeska Torres, Tarcísio Borges e Grazielle Pontes pela amizade e ajuda no começo dos experimentos.

Aos valiosos amigos Nayana Moura, Camila Magalhães, Fernando Cristian, Eliana Matos, Rômulo Malta, pela amizade e companheirismo durante toda a trajetória acadêmica.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica Marinha (BIOMAR-HPLC), Kelma Maria dos Santos Pires (em especial), Olavo Mourão e Márcia Barbosa, pela amizade e ajuda na execução deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Engenharia de Pesca que contribuíram para a minha formação profissional, em especial, ao Professor José Wilson Calíope de Freitas.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia de Pesca, em especial, a Leni Góis, que sempre presta seus serviços com zelo.

**SUMÁRIO**

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Polissacarídeos sulfatados	2
1.2 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados	4
1.3 Atividade anticoagulante	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Coleta da alga	10
2.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados	10
2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados	11
2.4. Reação metacromática dos polissacarídeos sulfatados	12
2.5. Detecção de carboidratos totais nas frações	12
2.6. Avaliação da atividade anticoagulante medida pelo teste do APTT (tempo de ativação parcial da tromboplastina).	13
2.7 Eletroforese em gel de agarose	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1. Extração de polissacarídeos sulfatados	15
3.2. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados	16
3.3. Avaliação da atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados pelo teste do APTT	18
3.4 Eletroforese em gel agarose 0,5%	21
4. CONCLUSÕES	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Macroalga marinha parda <i>Lobophora variegata</i> .	2
Figura 2. Fluxograma de extração de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda <i>Lobophora variegata</i> .	11
Figura 3. Fluxograma da dosagem de açúcar de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda <i>Lobophora variegata</i> .	13
Figura 4. Fluxograma de atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda <i>Lobophora variegata</i> .	14
Figura 5. Rendimento das extrações de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda <i>Lobophora variegata</i> .	15
Figura 6. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose dos extratos brutos obtidos na 1 <sup>a</sup> (A), 2 <sup>a</sup> (B), 3 <sup>a</sup> (C), 4 <sup>a</sup> (D) e 5 <sup>a</sup> (E) extrações da macroalga marinha parda <i>Lobophora variegata</i> . As frações foram monitoradas através da metacromasia e presença de açúcar (Dubois).	17
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,5% das frações obtidas na 1 <sup>a</sup> (A), 2 <sup>a</sup> (B), 3 <sup>a</sup> (C) e 4 <sup>a</sup> (D) extrações da alga marinha parda <i>Lobophora variegata</i> . Da esquerda para direita, extrato bruto (EB) e as frações, F1; F2; F3; F4 e F5.	22

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Atividade anticoagulante das frações de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda <i>Lobophora variegata</i> .	19

## RESUMO

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas complexas formadas por unidades repetitivas de açúcares e carregadas negativamente, e suas atividades biológicas tem despertado grande interesse na ciências médicas. O objetivo desse trabalho foi extrair, purificar e avaliar a atividade anticoagulante dos PS da alga marinha parda *Lobophora variegata*. Para a extração foram utilizados 2 g de alga seca que foram, inicialmente, hidratadas com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 + EDTA 5 mM + cisteína 5 mM. Em seguida, adicionou-se ao material uma solução de papaína bruta (30 mg.mL<sup>-1</sup>) e a mistura foi incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após uma filtração e centrifugação, os PS foram precipitados com cloreto de cetilpiridínio (CPC) e, posteriormente, precipitados, mais uma vez, com álcool etílico absoluto. Os PS foram então dissolvidos em uma solução de NaCl 2 M:etanol (100:15;v:v), lavados duas vezes com etanol 80% e uma vez com etanol absoluto. Em seguida, o material foi levado à estufa a 60°C para secagem, obtendo os PS totais. Posteriormente, os PS foram fracionados em uma coluna de DEAE-celulose acoplada a um coletor de frações, sendo eluídas com diferentes concentrações de NaCl. A presença dos PS nas frações foi monitorada pela reação metacromática e pelo teste de Dubois. A atividade anticoagulante foi determinada através do teste do APTT, utilizando um coagulômetro e plasma humano citratado. A extração dos PS da alga marinha parda *L. variegata* apresentou um rendimento de 28,4%. Os resultados obtidos no fracionamento mostraram que as frações mais metacromáticas foram eluídas com 0,5 e 0,7 M de NaCl e o teste de Dubois detectou uma maior presença de açúcar nas frações obtidas da 3ª extração. Com relação à atividade anticoagulante, de uma maneira geral, os PS de *L. variegata* apresentaram uma baixa atividade, com exceção da fração eluída com 1,2 M de NaCl, obtida no fracionamento dos PS obtidos da 1ª extração.

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE  
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA PARDA  
*Lobophora variegata***

**DANIEL BARROSO DE ALENCAR**

## **1. INTRODUÇÃO**

As algas constituem um grupo diversificado de vegetais pertencentes ao Reino Protista, sendo encontradas em ambientes marinhos e continentais. As macroalgas marinhas bentônicas habitam os costões rochosos sendo distribuídas em faixas bem definidas e visíveis em relação aos níveis de marés. São organismos estruturalmente complexos, o que reflete sua capacidade de sobreviver nos costões, onde duas vezes por dia estão sujeitas a amplas flutuações de umidade, temperatura, salinidade e luz. No ambiente marinho, exercem função comparada àquela exercida pelos vegetais no ambiente terrestre, fornecendo proteção para diversos organismos microscópicos, invertebrados e peixes que, inclusive, podem utilizá-las como alimento. As algas marinhas são classificadas em três divisões: Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas pardas) (RAVEN et al., 2001).

Para as algas da divisão Phaeophyta, Joly (1965) descreve a ocorrência de quatro classes, as quais podem sofrer ou não alternância de gerações durante o ciclo de vida. Suas células contêm tipicamente numerosos plastídios em forma de disco marrom-dourado que têm similaridades estruturais e bioquímicas com os plastídios das algas da divisão Crysophyta, com as quais elas podem ter tido uma origem comum. Além das clorofilas *a* e *c*, os cloroplastos das algas pardas também contêm vários carotenóides, incluindo uma grande quantidade de fucoxantina, uma xantofila que proporciona aos representantes desta divisão sua cor marrom escura ou verde oliva característica (RAVEN et al., 2001).

A alga marinha parda *Lobophora variegata* (FIGURA 1) é uma alga pertencente à ordem Dictyotales, família Dictyotaceae. Esta espécie possui um talo foliáceo expandido em forma de ventarola, prostrado, inteiro, pouco fendido longitudinalmente, plano ou mais comumente encurvado, de cor marrom escura, distintamente zonado, fixo ao substrato por uma porção basal constituída por filamentos rizoidais compactos e também por tufos de rizóides que nascem do lado inferior contribuindo para mantê-las firmemente presas às rochas. Possui comprimento de 2 a 4 cm, às vezes um pouco mais, e talo com crescimento por uma contínua margem de células apicais planas. O talo é constituído por até cinco camadas de células sendo a mediana grande e incolor. Os cromatóforos são restritos às porções externas e a espessura do talo é de 3 a 9  $\mu\text{m}$  (JOLY, 1965).

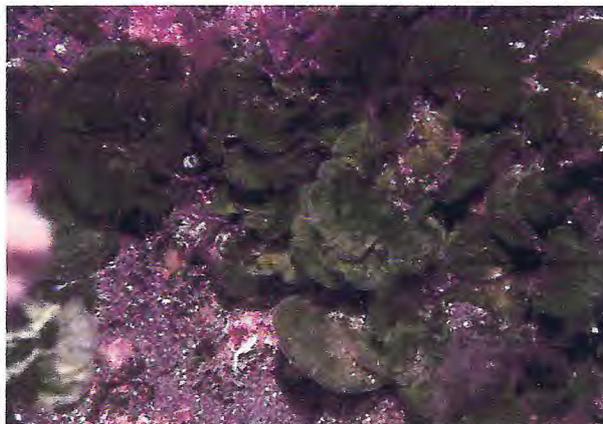


Figura 1. Macroalga marinha parda *Lobophora variegata*.

### 1.1 Polissacarídeos sulfatados

Os carboidratos são moléculas orgânicas que têm na sua estrutura química o radical poliidroxialdeído ou poliidroxicetona ou substâncias que liberam estes compostos por hidrólise e estão divididos em três classes principais de acordo com o seu tamanho: monossacarídeos, oligossacarídeos (dissacarídeos, trissacarídeos) e polissacarídeos, sendo os últimos constituídos por vários resíduos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas podendo ainda ser

lineares ou ramificados. Dentre os polissacarídeos mais comuns estão a celulose, o amido, o glicogênio e a quitina, esse último encontrado em artrópodes (NELSON; COX, 2006).

Os polissacarídeos podem apresentar o radical sulfato na sua estrutura química, sendo então denominados de polissacarídeos sulfatados que são polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares e carregados negativamente devido à presença desses radicais. Essas moléculas estão amplamente distribuídas tanto no reino animal (vertebrados e invertebrados), como no vegetal, onde são encontrados em grandes quantidades nas algas marinhas, porém, ausentes em plantas superiores (MATHEWS, 1975; CÁSSARO; DIETRICH, 1977; PAINTER, 1983; HUSSEIN et al., 1998). Recentemente, a presença desses polímeros foi detectada em gramíneas marinhas (AQUINO et al., 2005).

Geralmente os polissacarídeos sulfatados estão ligados covalentemente a uma proteína central, formando compostos de maior complexidade denominados de proteoglicanos. Nos vertebrados, esses proteoglicanos estão representados por açúcares sulfatados chamados de glicosaminoglicanos, dos quais os galactosaminoglicanos, condroitim sulfato e dermatam sulfato, e os glucosaminoglicanos, heparina e ácido hialurônico, são os mais conhecidos (KJELLÉN; LINDAHL, 1991).

Os polissacarídeos sulfatados são encontrados na forma de fucanas nas algas marinhas pardas (Phaeophyta), como galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyta), e como arabino-galactanas nas algas verdes (Chlorophyta). As principais galactanas sulfatadas encontradas nas algas vermelhas são o ágar e as carragenanas (PERCIVAL, McDOWEL, 1967).

O ágar é um composto insolúvel em água fria, mas solúvel em água quente, formado de monômeros de galactose. Foi o primeiro ficocolóide a ser usado na indústria alimentícia na forma de géis e em diversas outras aplicações industriais, como aditivos em alimentos (MEER, 1980).

Outro polissacarídeo muito valorizado comercialmente é a carragenana, um polímero altamente sulfatado que detém propriedades aniônicas e hidrofílicas o

que permite os mais diferentes usos, como na fabricação de sorvetes, produtos de leite pasteurizado, chocolates, estabilização de emulsificantes e cremes aerossóis (GUISELEY et al., 1980).

Já o alginato possui em sua composição química, o ácido manurônico e gulurônico, sendo encontrado somente nas algas marinhas pardas. Espécies dos gêneros *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* e *Turbinaria* são grandes produtoras desse ficocolóide. Os alginatos podem ser usados como produtos farmacêuticos, em alimentos, na fabricação de papéis etc (HILTON, 1969; McNEELY; PETTITT, 1973).

## 1.2 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados

Nos últimos anos, a busca por novos compostos com aplicação 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, antiviral, antitumoral e/ou antibacteriana extraídos de invertebrados e de algas (micro e macroalgas) (HAYASHI et al., 1996; BICK, FAREED, 1997; JENEY et al., 1997; VADSTEIN, 1997; MILES et al., 2001; CHOTIGEAT et al., 2004; WANG et al., 2004; ZHOU et al., 2004 TALARICO et al., 2005).

A propriedade antiviral dos polissacarídeos sulfatados é reconhecida há vários anos (ANDERSSON et al., 1979). Atualmente, vários trabalhos têm sido publicados como o de Sugawara et al. (1989), que relata um tipo de fucoídano, originário da alga marinha parda *Fucus vesiculosus* capaz de inibir o vírus da imunodeficiência humana (HIV) *in vitro*. Este mesmo polímero também apresentou uma eficiente atividade citotóxica e mitotóxica contra o veneno das serpentes *Bothrops asper*, *Cerrophidion godmani*, *Atropoides nummifer* e *Bothriechis schlegelii* (ANGULO; LOMONTE, 2003).

Existem outras atividades biológicas que merecem destaques, tais como antiinflamatória, antiproliferativa, antimetastática e antiadesiva. Alguns trabalhos

relatam o efeito inibitório do fucoidam, galactanas, ulvanas, arabinanas e mananas contra o vírus do herpes simples tipos I e II (BOISSON-VIDAL et al., 1995; GHOSH et al., 2004; MAZUMDER et al., 2002; TALARICO et al., 2004; ZHOU et al., 2004). Os polissacarídeos sulfatados extraídos das algas *Nothogenia fastigiata* e *Gracilaria corticata* (vermelhas) e *Sargassum horneri* (parda) apresentaram uma potente atividade contra o vírus do herpes simples tipo I, através da inibição do ancoramento do vírus na célula hospedeira (DAMONTE et al., 1994; HOSHINO et al., 1998; MAZUMDER et al., 2002).

Segundo Zhang et al. (2003), uma fração obtida do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Porphyra haitanesis* apresentou efeito inibitório contra a peroxidação lipídica *in vitro*, revelando também uma relação dose-dependente em ensaios *in vivo* em camundongos.

Vários estudos também reportam a atividade antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados. Martinichen-Herrero et al. (2005) relatam o grande desenvolvimento em pesquisas desses polímeros que, além da atividade anticoagulante, possuem efeito antitrombótico. Além disso, os cientistas também abordaram um estudo *in vivo* realizado com o polissacarídeo isolado do líquen, *Parmotrema mantiqueirense*, através da administração intravenosa em ratos. Os autores concluíram que a dosagem de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal representou a dose ótima para inibir a formação de trombos.

A atividade antitrombótica do polissacarídeo sulfatado extraído do pepino-do-mar foi investigada em um modelo de trombose experimental em coelhos e, após a administração intravenosa do polímero nativo, a formação de trombos foi reduzida de uma maneira dose-dependente, sendo completamente abolida na dose de 1,5 mg.kg<sup>-1</sup> (MOURÃO et al., 1998). Por outro lado, Farias et al. (2001) mostraram que o polissacarídeo sulfatado, extraído da macroalga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, também inibiu a trombose neste mesmo modelo, no entanto, não foi observada uma dose-dependência, estando a atividade restrita a uma determinada dose.

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.

Koyanagi et al. (2003) relataram que o fucoidam, extraído da alga marinha parda *Fucus vesiculosus*, apresentou uma significativa atividade antitumoral, mostrando uma ação inibitória no progresso de tumores malignos.

Muitos polissacarídeos têm apresentado um efeito imunoestimulante quando administrados às larvas de peixes e camarões (SAKAI, 1999; VARGAS-ALBORES; YEPIZ-PLASCENCIA, 2000; PARK, Do JEONG, 1996; MILES et al., 2001). A atividade imunoestimulante em juvenis do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, através de sua imersão em soluções de um polissacarídeo sulfatado extraído da microalga cianofíceia *Cyanotheca* sp foi o primeiro relato do uso de polissacarídeos sulfatados de microalgas como imunoestimulantes (CAMPA-CÓRDOVA et al., 2002).

Os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* foram incorporados em ração para pós-larvas de tilápias, sendo observado um crescimento bastante diferenciado nos indivíduos que receberam determinada dose do polissacarídeo (FARIAS et al., 2004). Além disso, quando esses mesmos polissacarídeos sulfatados foram utilizados em banhos de imersão em pós-larvas do camarão *L. vannamei*, sua sobrevivência foi aumentada (BARROSO et al., 2007). Este efeito de aceleração do crescimento ou melhoria na sobrevivência tem sido relatado como um efeito adicional da imunoestimulação (SAKAI, 1999).

Huang et al. (2006) reportaram o uso do extrato bruto obtido da alga marinha parda *Sargassum fusiforme* em ração para camarões. Os resultados mostraram que, após 30 dias de administração, os camarões, *Fenneropenaeus chinensis*, infectados com *Vibrio harveyi*, se tornaram resistentes ao patógeno.

### 1.3 Atividade anticoagulante

O mecanismo de coagulação sanguínea consiste simplesmente na “conversão” do sangue líquido em coágulo. Para que isso ocorra, é necessário a transformação do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis através de uma complexa interação enzimática (RANG et al., 2001).

A heparina é um polissacarídeo sulfatado que apresenta uma alta atividade anticoagulante e é extraída de pulmão bovino ou de intestino suíno, sendo as heparinas de baixo peso molecular as mais utilizadas na clínica médica (RANG et al., 2001). Porém, os efeitos adversos desse composto, como episódios de sangramento e queda na contagem de plaquetas, justificam a busca de novas substâncias anticoagulantes (THOMAS, 1997).

A primeira descrição da atividade anticoagulante de um polissacarídeo de alga marinha foi feita por Chargaff et al. (1936), relatando o efeito anticoagulante de uma galactana sulfatada extraída da espécie *Iridaea laminarioides* (da família Gigartinaceae).

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 dextram, nas fucanas e galactanas sulfatadas (THOMAS et al., 1989; COLLIEC et al., 1991; NISHINO et al., 1991; NISHINO; NAGUMO, 1992).

Graufell et al. (1989) mostraram que as fucanas sulfatadas, extraídas das algas pardas *Laminaria digitata*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassum muticum* e *Ascophyllum nodosum* possuem propriedades anticoagulantes. Segundo os autores, esses polissacarídeos exercem um efeito inibitório direto sobre a trombina independentemente de antitrombina.

Sete espécies de algas marinhas verdes (*Monostroma nitidum*, *Codium fragile*) e pardas (*Laminaria ochotensis*, *Hizikia fusiformis*, *Sargassum horneri*, *S. siliquastrum* e *Myagropsis myagroides*), dentre as 22 espécies analisadas por Athukorala et al. (2007) apresentaram alto potencial anticoagulante.

A alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* possui uma galactana sulfatada com elevada atividade anticoagulante (semelhante à heparina) determinada pela presença de dois ésteres de sulfato em um único resíduo de galactose (FARIAS et al., 2000).

A atividade anticoagulante de um xilofucoglucuronano sulfatado, obtido por digestão enzimática da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* foi avaliada por Leite et al. (1998). Segundo os autores, as frações obtidas por cromatografia em coluna de troca iônica apresentaram uma atividade anticoagulante inferior a da heparina padrão.

Segundo Ghosh et al. (2004), o extrato bruto obtido da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* não apresentou atividade anticoagulante, verificada através do tempo de ativação da tromboplastina (APTT) e do tempo da trombina (TT), comparados com aqueles obtidos com a heparina padrão.

Invertebrados marinhos (moluscos, equinodermas e ascídias) também possuem polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante. No caso das ascídias, o polímero é denominado dermatan sulfato. Outro polissacarídeo sulfatado, o condroitim sulfato fucosilado, isolado do pepino-do-mar *Ludwigothuria grisea*, também possui atividade anticoagulante e antitrombótica (BURSON et al., 1956; PAVÃO et al., 1998).

Burson et al. (1956) isolaram dos moluscos *Maetrus pussula* e *Cyprinia islandica* um composto denominado de “mactina”, que apresentou atividade anticoagulante, sendo estruturalmente semelhante à heparina.

Dellias et al. (2004) compararam o dermatan sulfato purificado obtido das peles ventrais de três espécies de raias da costa brasileira, *Dasyatis americana*, *D. gutatta* e *Aetobatus narinari* e, uma espécie que habita o rio Amazonas, *Potamotrygon motoro*. A ação anticoagulante do dermatan sulfato obtido dessas quatro espécies, mensurada pelo teste do APTT, foi comparada a do dermatan sulfato de mamíferos. O dermatan sulfato de *D. americana* exibiu elevada atividade anticoagulante, enquanto o dermatan sulfato de *D. gutatta* mostrou atividade semelhante ao dermatan sulfato de mamíferos. Não foi mensurada a atividade do dermatan sulfato de *A. narinari* e *P. motoro*.

O objetivo desse trabalho foi extrair, purificar e avaliar a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *L. variegata*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta da alga

Os exemplares da alga marinha parda *Lobophora variegata* 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 foram lavadas com água corrente para retirar as epífitas e outros organismos. Em seguida, as algas foram secas ao sol e cortadas em pequenos pedaços.

### 2.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados

A extração foi realizada a partir do tecido seco (2 g), previamente cortado e hidratado 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 (30 mg.mL<sup>-1</sup>), sendo a mistura incubada em banho maria (60°C; 24 h).

Após esse período, a mistura foi filtrada e centrifugada (14.000 rpm; 20 min; 4°C) e, ao sobrenadante, foram adicionados 6,4 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) 10% para precipitar os polissacarídeos sulfatados (PS) (25°C; 24 h). Após a precipitação, os PS foram centrifugados e o precipitado foi lavado com 200 mL de CPC 0,05% sendo, posteriormente, dissolvido em 70 mL de uma solução de NaCl 2 M:etanol absoluto (100:15;v:v). Em seguida, os PS foram submetidos a uma nova precipitação (4°C; 24 h) com a adição de 122 mL de etanol absoluto. Posteriormente, os PS lavados duas vezes com 200 mL de etanol 80% e uma vez com 122 mL de etanol absoluto foram, levados à estufa (60°C; 24 h) para secagem. O resíduo obtido da extração foi submetido a novas extrações com o objetivo de otimizar o rendimento dos PS (Figura 2).

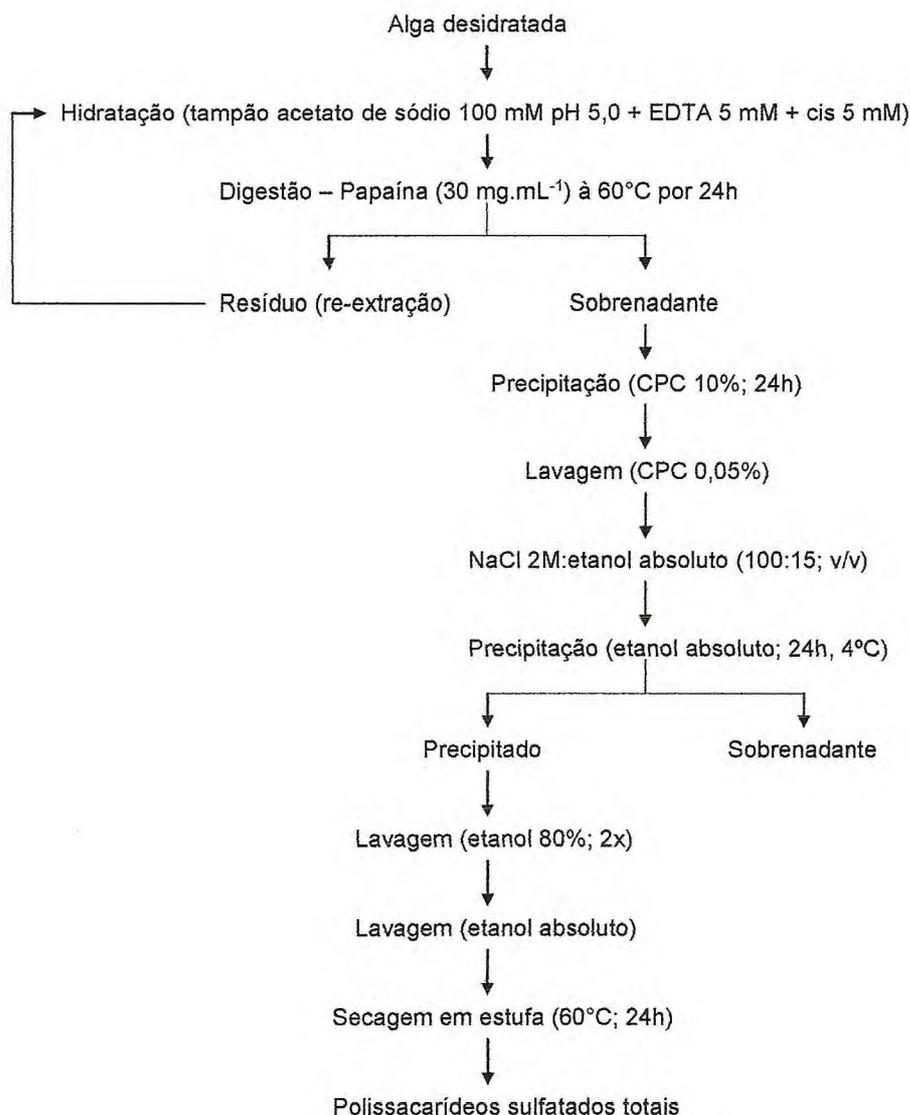


Figura 2. Fluxograma de extração de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda *Lobophora variegata*.

### 2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados

Os PS foram submetidos a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 + EDTA 5 mM + cisteína 5 mM e o fluxo foi mantido em 60 mL.h<sup>-1</sup>. Em todas as cromatografias, foi aplicada, no topo do gel, uma alíquota de 1 mL de uma

solução de PS ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e a eluição da coluna realizou-se, passo a passo, com o tampão de equilíbrio contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6 M), sendo coletadas frações de 1 mL.

#### **2.4. Reação metacromática dos polissacarídeos sulfatados**

A reação metacromática foi realizada adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  de cada fração, obtida durante a eluição da coluna de DEAE-celulose, a 1 mL de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB), que é um indicador específico para grupos sulfatados, mudando sua coloração na presença dos PS. Essa atividade foi determinada no espectrofotômetro, através da leitura da absorbância a 525 nm.

#### **2.5. Detecção de carboidratos totais nas frações**

A presença de carboidratos totais nas frações foi avaliada pelo método de Dubois et al. (1956). Inicialmente, 50  $\mu\text{L}$  de cada fração foram adicionados a 350  $\mu\text{L}$  água destilada. Em seguida, 20  $\mu\text{L}$  de fenol 5% redestilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado foram misturados, permanecendo em repouso por 30 minutos. Após esse período, a mistura foi levada ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância a 490 nm (Figura 3).



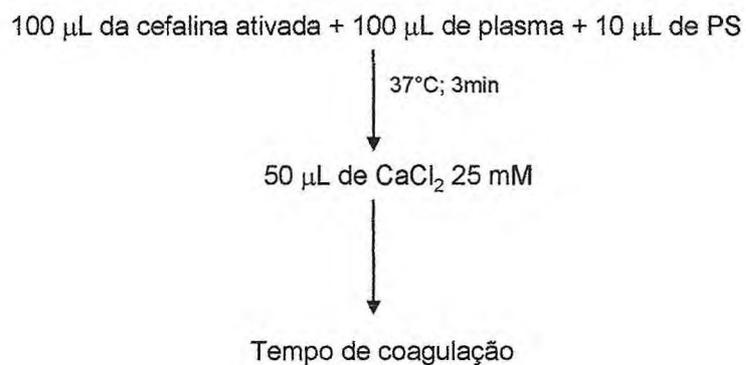


Figura 4. Fluxograma de atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda *Lobophora variegata*.

## 2.7 Eletroforese em gel de agarose

Os PS foram analisados por eletroforese em gel de agarose (VIEIRA et al., 1991). Cerca de 20 µL de cada fração foi aplicado em um gel de agarose a 0,5% em tampão acetato 1,3-diaminopropano 50 mM, e a corrida foi realizada a 110V por 80 min. Em seguida, os PS foram fixados no gel com uma solução de brometo de N-cetil-N,N,N-trimetilamônio a 0,1% durante 24 h. Após a fixação, o gel foi secado e corado com azul de toluidina a 0,1% em ácido acético glacial:etanol absoluto:água (1:49,5:49,5, v/v/v).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Extração de polissacarídeos sulfatados

No processo de extração dos PS da alga marinha parda *Lobophora variegata*, foram realizadas cinco extrações, o que resultou em um rendimento total de 28,4%. Além disso, a 3<sup>a</sup> e a 4<sup>a</sup> extrações apresentaram os maiores rendimentos, correspondendo 12,2% e 7,3%, respectivamente (Figura 5).

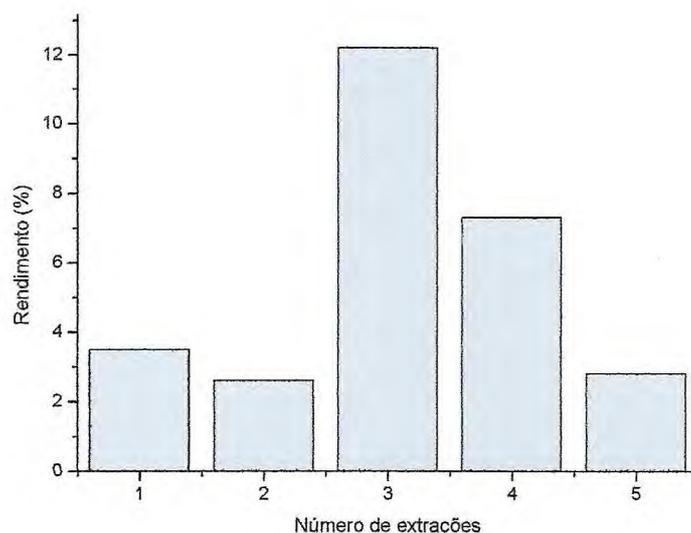


Figura 5. Rendimento das extrações de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda *Lobophora variegata*.

Em trabalhos envolvendo a extração de PS de algas marinhas, os extratos brutos obtidos da alga vermelha *Gracilaria cornea* (MELO et al., 2002) e da alga parda *Sargassum polycystum* (CHOTIGEAT et al., 2004) apresentaram rendimentos de 21,4 e 22,3%, respectivamente. Os extratos obtidos das algas vermelhas *Solieria filiformis* (PONTES, 2005), *Champia feldmannii* (TORRES, 2005), *Halymenia sp* e *H. pseudofloresia* (RODRIGUES, 2006) e *Gracilaria caudata* (ARAUJO, 2006) resultaram, em rendimentos de 46,8, 36,2, 53,96, 47,14

e 36,1%, respectivamente. Já os extratos brutos de algas pertencente à divisão Chlorophyta, como as espécies *Caulerpa racemosa* (RODRIGUES; FARIAS, 2005) e *C. sertularioides* (BEZERRA-NETO, 2005) renderam 13,0 e 7,1%, respectivamente. Como é possível observar, existe uma grande variação nos rendimentos de PS extraídos de algas marinhas devido, tanto ao emprego de diferentes metodologias de extração como a utilização de diferentes espécies (CHOTIGEAT et al., 2004).

De acordo com Rodrigues (2006), o maior rendimento de PS das algas marinhas vermelhas *Halymenia* sp e *H. pseudofloresia* foram obtidos na 1ª extração, sendo decrescente nas demais. Esse comportamento também foi observado nas algas marinhas vermelhas, *S. filiformis* e *G. caudata* (PONTES, 2005, ARAUJO, 2006) e na alga marinha verde *C. sertularioides* (BEZERRA-NETO, 2005), diferentemente do encontrado na alga marinha parda *L. variegata* que foi verificado um aumento no rendimento, a partir da 2ª incubação, e na alga marinha vermelha *C. feldmanni* (TORRES, 2005) e em uma alga marinha parda do gênero *Sargassum* (PEREIRA, 2006).

### **3.2. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados**

Com relação ao fracionamento, as frações eluídas com 0,5 e 0,7 M de NaCl foram as mais metacromáticas, sendo a eluída com 0,7 M maior na 1ª e 2ª extrações e a eluída com 0,5 M maior na 3ª e 5ª extrações. Na 4ª extração, a metacromasia das frações eluídas com 0,5 e 0,7 M de sal foi praticamente igual. No tocante à presença de açúcar, o perfil foi muito semelhante em todas as extrações com exceção da 3ª extração, na qual foi observada uma maior presença de açúcar nas frações eluídas com 0,9, 1,2 e 1,6 M de sal, isto explica o fato da 3ª extração possuir o maior rendimento que as demais extrações (Figura 6).

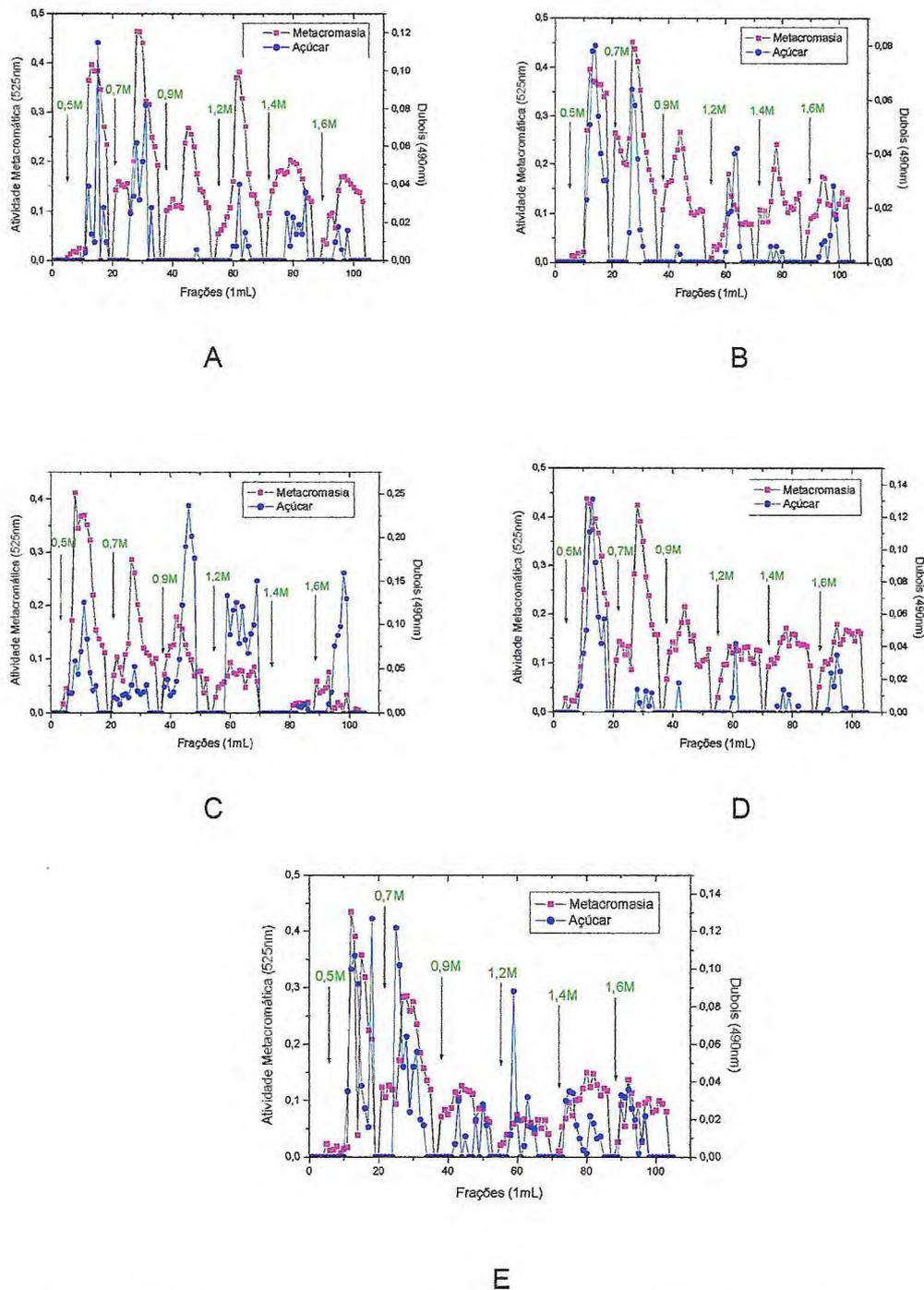


Figura 6. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose dos extratos brutos obtidos na 1<sup>a</sup> (A), 2<sup>a</sup> (B), 3<sup>a</sup> (C), 4<sup>a</sup> (D) e 5<sup>a</sup> (E) extrações da macroalga marinha parda *Lobophora variegata*. As frações foram monitoradas através da metacromasia e presença de açúcar (Dubois).

Rodrigues (2006) observou, no fracionamento dos PS da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* e *Halymenia* sp, um aumento significativo na atividade metacromática das frações 0,5; 0,75 e 1,25 M de NaCl no decorrer das extrações.

Resultados semelhantes foram observados no fracionamento dos PS das algas marinhas verdes *C. sertularioides* e *C. racemosa*, e das algas marinhas vermelhas *S. filiformes* e *C. feldmanii*, quando também foram observadas diferenças significativas entre as metacromasias das frações, eluídas em coluna de DEAE-celulose, durante o processo de extrações sucessivas (BEZERRA-NETO, 2005; PONTES, 2005; RODRIGUES; FARIAS, 2005, TORRES, 2005).

### **3.3 Avaliação da atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados pelo teste do APTT**

A tabela 1 mostra o tempo de coagulação do plasma humano incubado com as frações de PS obtidas da alga marinha *L. variegata*.

Como se pode observar, os PS de *L. variegata* apresentaram uma baixa atividade anticoagulante, prolongando muito pouco o tempo de coagulação, com exceção da fração eluída com 1,2 M de NaCl proveniente da 1<sup>a</sup> extração, a qual duplicou o tempo de coagulação normal do plasma humano ( $T_0 = 45,6s$ ).

Tabela 1. Atividade anticoagulante das frações de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha parda *Lobophora variegata*.

Extração	Fração (M)	Tempo de coagulação (s)	APTT (T <sub>1</sub> /T <sub>0</sub> )
1 <sup>a</sup>	0,5	48,4	1,1
	0,7	48,9	1,1
	0,9	53,9	1,2
	1,2	96,0	2,1
	1,4	63,4	1,4
	1,6	73,0	1,6
2 <sup>a</sup>	0,5	41,4	0,9
	0,7	47,1	1,0
	0,9	52,0	1,1
	1,2	54,8	1,2
	1,4	77,7	1,7
	1,6	72,4	1,6
3 <sup>a</sup>	0,5	42,6	0,9
	0,7	46,0	1,0
	0,9	53,1	1,2
	1,2	45,0	1,0
	1,4	53,6	1,2
	1,6	52,0	1,1
4 <sup>a</sup>	0,5	45,4	1,0
	0,7	48,2	1,1
	0,9	46,6	1,0
	1,2	46,3	1,0
	1,4	52,1	1,1
	1,6	56,2	1,2
5 <sup>a</sup>	0,5	55,0	1,2
	0,7	61,2	1,3
	0,9	52,2	1,1
	1,2	55,0	1,2
	1,4	63,0	1,4
	1,6	72,2	1,6

Rodrigues (2006) observou que, após o fracionamento dos PS da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia*, a fração eluída com 1,25 M de NaCl da 1ª extração apresentou a maior atividade anticoagulante, prolongando o tempo de coagulação do plasma de coelho em cerca de 9,0 vezes.

Em relação à espécie *Halymenia* sp, a fração mais ativa foi eluída com 0,75 M de NaCl, na 1ª e 3ª extrações. No entanto, a atividade dessa fração passou de 110,4 na 1ª extração, para 143,1 UI.mg<sup>-1</sup> na 3ª extração, prolongando, neste último caso, o tempo de coagulação do plasma de coelho em 2,77 vezes (RODRIGUES, 2006).

Rodrigues; Farias (2005) realizaram quatro extrações de polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *C. racemosa* e observaram uma baixa atividade anticoagulante na maioria das frações. No entanto, as frações eluídas com 1,8 e 2,0 M de NaCl na 4ª extração, prolongaram o tempo de coagulação do plasma humano em cerca de 6,5 vezes, sendo muito superior as demais que prolongaram, no máximo, em 1,8 vezes o referido tempo.

Torres (2005) também observou a presença da atividade anticoagulante em PS da alga marinha vermelha *C. feldmannii*. As frações eluídas na 4ª extração com 1,2 e 1,4 M de NaCl tiveram seus tempos de APTT prolongados em cerca de 6,4 e 4,8 vezes, respectivamente, diferindo das frações isoladas das demais extrações, cujas atividades anticoagulantes foram bem menores. Por outro lado, Pontes (2005) e Bezerra-Neto (2005) mostraram que as frações obtidas dos PS da alga marinha vermelha *S. filiformis* e da alga marinha verde *C. sertularioides* praticamente não modificaram do tempo de coagulação sanguínea, no decorrer das sucessivas extrações.

Como é possível observar, existe uma grande variedade nas atividades anticoagulante dos PS de algas marinhas. Esta atividade é diferente entre diferentes espécies de algas marinhas, bem como pode sofrer alterações no decorrer de extrações sucessivas dos PS de uma mesma espécie de alga. Apresentar uma baixa atividade anticoagulante não significa dizer que o PS não apresente outro tipo de atividade. Hayashi et al. (1996) purificaram um PS, denominado de "cálcio spirulan", obtido da microalga cianofícea *Spirulina*

*platensis*, que apresentou uma baixa atividade anticoagulante, porém uma elevada atividade antiviral contra os vírus do herpes simples tipo I (HSV-I) e vírus da imunodeficiência adquirida tipo I (HIV-I). Além disso, no caso do PS apresentar outro tipo de atividade biológica, é importante não possuir uma elevada atividade anticoagulante para não alterar o tempo de coagulação normal, quando for necessária a administração de doses mais altas.

Farias et al. (2000) reportaram acentuada atividade anticoagulante de uma D-galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*. Esse polissacarídeo também apresentou uma potente atividade antitrombótica em ratos, no entanto a dose antitrombótica foi cerca de 20 vezes menor do que a dose anticoagulante, ou seja, o PS não alterou a coagulação sanguínea para exercer o efeito antitrombótico (FARIAS et al., 2001).

### **3.4 Eletroforese em gel agarose 0,5%**

A fração eluída com 0,5 M de NaCl foi a mais evidente nas eletroforeses e, além disso, foi se tornando mais purificada no decorrer das extrações. As bandas referentes às frações F2, F3 e F4 foram mais evidentes apenas na 1ª incubação, se tornando mais fracas nas demais. A fração F5 praticamente não apareceu nas eletroforeses (Figura 7).

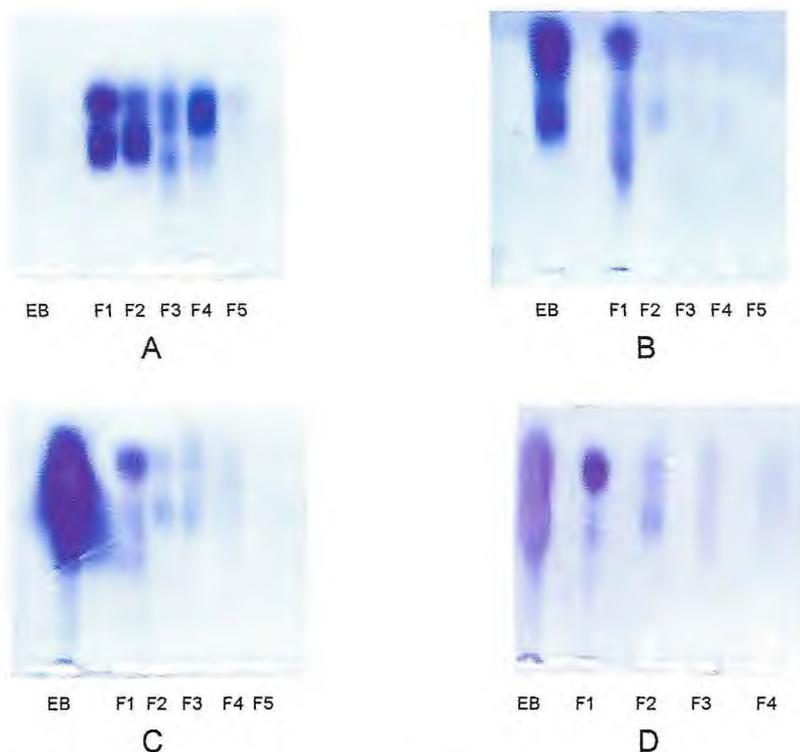


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,5% das frações obtidas na 1<sup>a</sup> (A), 2<sup>a</sup> (B), 3<sup>a</sup> (C) e 4<sup>a</sup> (D) extrações da alga marinha parda *Lobophora variegata*. Da esquerda para direita, extrato bruto (EB) e as frações, F1, F2, F3, F4 e F5.

Rodrigues (2006) observou que as frações obtidas na 3<sup>a</sup> extração de PS da alga marinha vermelha *Halymenia* sp apresentaram bandas mais definidas no gel de agarose, indicando um maior grau de purificação, ou seja, foi se tornando mais purificada no decorrer das extrações.

O fato de se obter bandas mais definidas na eletroforese de frações obtidas, a partir das extrações sucessivas de PS de algas marinhas, pode indicar que o grau de complexidade dessas moléculas talvez esteja diminuindo no decorrer das extrações, o que pode ser bastante útil para a caracterização estrutural desses compostos, já que essas moléculas são muito complexas e heterogêneas (FARIAS et al., 2000).

#### 4. CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo foi possível, através de extrações sucessivas, otimizar o rendimento dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata*. Além disso, o processo de extrações sucessivas resultou em uma maior purificação da fração eluída com 0,5 M de NaCl em coluna de DEAE-celulose, a qual poderá ser utilizada em ensaios antitumorais, antiinflamatórios e imunoestimulantes *in vivo*, bem como facilitar sua caracterização estrutural. De uma maneira geral, as frações obtidas nas várias extrações praticamente não foram anticoagulantes, com exceção da fração eluída com 1,2 M de NaCl proveniente da 1<sup>a</sup> extração, a qual duplicou o tempo de coagulação normal do plasma humano.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v.9, n.6, p.575-580, Dec 1976.

ANDERSSON, L.O.; BARROWCLIFFE, T.W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E.A.; SODERSTROM, G., Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma. **Thrombosis Research**, v. 15, p. 531-541, 1979.

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.

ARAUJO, G.S. **Efeito imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* na reversão sexual de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1766) em condições adversas.** 2006. 57f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ATHUKORALA Y.; LEE, K.W.; KIM, S.K.; JEON, Y.J. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, Oxford, v.98, n.9, p.1711-1716, Jul 2007.

BARROSO, F.E.; RODRIGUES, J.A.G.; TORRES, V.M.; SAMPAIO, A.H.; FARIAS, W.R.L. Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.38, n.1, p.58-63, 2007.

BEZERRA-NETO, J.T.B. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* (Caulerpales, Caulerpáceae).** 29f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

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.

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

CAMPA-CÓRDOVA, A.I.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N.Y.; DE PHILIPPIS, R.; ASCENCIO, F. Generation of superoxide anion and SOG activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v, 12, p. 353-366, Apr 2002.

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. **Journal of Biological Chemistry**, Stanford, 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.

DAMONTE, E.; NEYTS, J.; PUJOL, C.A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.; COTO, C.E.; DE CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.47, n.12, p.2187-2192, Jun 1994.

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*. **Biochimie**, Paris, v. 86, n.9-10, p. 677-683, Sep-Oct 2004.

DIETRICH, C. P.; A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 17: 5-15, 1984.

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.350-354, 1956.

FARIAS, W.R.L.; REBOUÇAS, H.J.; TORRES, V.M.; RODRIGUES, J.A.G.; PONTES, G.C.; SILVA, F.H.O.; SAMPAIO, A.H. Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.35, número especial, p.189-195, out 2004.

FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A.; MOURÃO, P.A.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *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.; 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 alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, n.38, p.29299-29307, Sep 2000.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 23, p. 3151-3157, Dec 2004.

GRAUFFEL, V.; KLOAREG, B.; MABEAU, S.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from brown algae. **Biomaterials**, Oxford, v.10, n.6, p.363-368, Aug 1989.

GUISELEY, K.B.; STANLEY, N.F.; WHITEHOUSE, P.A. Carrageenan. In: **Handbook of water-soluble gums**. New York: McGraw-Hill Book Co, p.5.1-5.30, 1980.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, 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**, Larchmont, v.12, n.15, p.1463-1471, Oct 1996.

HILTON, K.A. Alginates in textile printing. In: **CIBA Review**. Basel, Switzerland, CIBA, p.19-46, 1969.

HOSHINO, T.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; HAMADA, J.; LEE, J.B.; SANKAWA, U. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 7, p. 730-734, 1998.

HUANG, X.; ZHOU, H.Q.; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.20, n.5, p.750-757, May 2006.

HUSSEIN, M.M.D.; HELMY, W.A.; SALEM, H.M. Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivatives. **Phytochemistry**, Oxford, v.48, n.3, p.479-484, Jun 1998.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, Amsterdam, v.154, n.1, p.1-15, Jul 1997.

JOLY, A.B. **Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**. São Paulo. 1965, p. 406.

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

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 65, p. 173-179, Jan 2003.

LEITE, E.L.; MEDEIROS, G.L.; ROCHA, H.A.O.; FARIAS, G.G.M.; SILVA, L.F.; CHAVANTE, S.F.; ABREU, L.D.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Structure and pharmacological activity of a sulfated xylofucoglucurinan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant Science**, Clare, v.132, n.2, p.215-228, Mar 1998.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirense* Hale. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.60, n.1, p.7-13, Apr 2005.

MATHEWS, M.B. Polyanionic proteoglycans. In KLEINZELLER, A., SPRINGER, G.F.; WITMANN, H.G. (eds.), **Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution**. Springer-Verlag, Berlin, pp. 93-125, 1975.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.31, n.1-3, p.87-95, Dec 2002.

MCNEELY, W.H.; PETTITT, D.J. Algin. In: **Industrial gums**. 2 ed., New York: Academic Press, p.31-49, 1973.

MEER, W. In: **Handbook of water soluble gums and resins**. New York: Mcgraw-Hill, p.7.1-7.19, 1980.

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**, Oxford, v.49, n.4, p.491-498, Sep 2002.

MILES, D.J.C.; POLCHANA, J.; LILLEY, J.H.; KANCHANAKHAN, S.; THOMPSON, K.; ADAMS, A. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 195, n. 1-2, p. 1-15, Apr 2001.

MOURÃO, P.A.S.; GUIMARÃES, M.A.M.; MULLOY, B.; THOMAS, S.; GRAY, E. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 101, n. 4, p. 647-652, Jun 1998.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Carboidratos e Glicobiologia. In \_\_\_\_\_. **Lenhinger Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Savier, 2006. cap. 7, p. 236-270.

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.

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

PARK, K. H.; DO JEONG, H. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. **Aquaculture**, v. 143, pp. 135-143, 1996.

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 sulfate from ascidians: structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, n.43, p.27848-27857, Oct 1998.

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

PEREIRA, A.P.; RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração e otimização de rendimento dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Sargassum* sp. In: **VI ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO / VI ENCONTRO DE**

**INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO CEFET CE**, 1., 2006, Fortaleza. **Anais...CEFET CE: VI ENPPG/VI ENICIT**, 2006. CD-Rom.

PONTES, G.C. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Solieraceae, Rhodophyta)**. 30f. Monografia. (Graduação) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4ª edição, 2001, 703p.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Protista II: Heterocontas e algas verdes. In: \_\_\_\_\_. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 17, p.356-383.

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). In: **XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA**, 1., p. 1693-1701, 2005, Fortaleza. **Anais....Ceará, XIV CONBEP**, 2005. CD-Rom.

RODRIGUES, J.A.G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

SAKAI, M. Fish immunostimulants: The application for aquaculture. **Faculty of Agriculture Miyazaki University**, p. 19-21, Japan, 1999.

SUGAWARA, I.; ITOH, W.; KIMURA, S.; MORI, S.; SHIMADA, K.. Further characterization of sulfated homopolysaccharide as anti-HIVagents. **Experientia**, Basel, v.45, n.10, p. 996-998, Oct 1989.

TALARICO, L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; NOSEDA, M.E.R.; DAMONTE, E.B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, Amsterdam, v.66, n.2-3, 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 *Crytonemia 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.

TORRES, V.M. **Extração, purificação e atividade biológica de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Champia feldmannii***. 28f. Monografia. (Graduação) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

VADSTEIN, O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture**, Amsterdam, v.155, n.1-4, p.401-417, Sep 1997.

VARGAS-ALBORES, F.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, p. 13-21, 2000.

VIEIRA, R.P., MULLOY, B., MOURÃO P.A.S. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo- $\beta$ -D-glucuronosyl residues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.266, n.21, p.13530-13536, Jul 1991.

WANG, Y.F; ZHANG, L.N; LI, Y.Q; HOU, X.H; ZENG, F.B. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a  $\beta$ -glucan from *Poria cocos sclerotium*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v.339, n.15, p.2567-2574, Oct 2004.

ZHANG, Q.B; LI, N.; ZHOU, G.F; LU, X.L; XU, Z.H; LI, Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. **Pharmacological Research**, London, v.48, n.2, p.151-155, Aug 2003.

ZHOU, G.; SUN, Y.P; XIN, H.; ZHANG, Y.N; LI, Z.; XU, Z.H. 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.