



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

**EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS  
DA ALGA MARINHA VERMELHA *Champia feldmannii*.**

**VALESKA MARTINS TORRES**

---

**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, D.Sc**  
**Orientador/Presidente**

---

**Profª. Alexandre Holanda Sampaio, PhD**  
**Membro**

---

**Profª. Tito Monteiro da Cruz Lotufo, D.Sc**  
**Membro**

**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)

---

T649e Torres, Valeska Martins.

Extração, purificação e atividade biológica de polissacarídeos sulfatados da Alga  
Marianha vermelha *Champia feldemannii* / Valeska Martins Torres. – 2005.  
37 f. : il.

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 - Cultivo. 2. Alga Marinha Vermelha. 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

---

“Quando você começar seu caminho, vai encontrar uma porta com uma frase escrita – diz o mestre. –

Volte e me conte qual é esta frase.

O discípulo se entrega de corpo e alma a sua busca. Chega um dia em que vê a porta, e volta até o mestre.

- Estava escrito no começo do caminho: isto não é possível – diz.

- Onde estava escrito isto, num muro ou numa porta? – pergunta o mestre.

- Numa porta – responde o discípulo.

- Pois coloque a mão na maçaneta e abra.

O discípulo obedece. Como a frase está pintada na porta, também vai se movendo com ela. Com a porta totalmente aberta, ela já não consegue mais enxergar a frase – e segue adiante.”

MAKTUB

Dedico a toda a minha família e, em especial,  
a minha mãe Maria Valderez e ao meu pai  
Vicente. Dedico também ao meu amor,  
Roberto pelo seu carinho e apoio.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me iluminando, guiando e orientado em todos os momentos de minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

A meus pais, que me deram educação, apoio moral e financeiro, para a minha realização pessoal.

A toda minha família que sempre me apoiou na minha escolha profissional.

Ao meu amor, Roberto Maia, que sempre me apoiou incondicionalmente e me deu força para vencer mais uma batalha.

A minha melhor amiga, Liza Araújo, por sua amizade e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Wladimir, pela sua paciência, atenção, dedicação e, acima de tudo, sua amizade, durante todo esse período de trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Aos professores Silvana e Alexandre Sampaio, pela amizade e atenção, nos momentos que necessitei de alguma ajuda, muito obrigado.

Aos integrantes do Grupo GEAMAR, e companheiros de laboratório, Tarcisio, Ariévilo, Grazielle, Nayana, Pedro, Daniel, Jefferson e Nivalda, por sua ajuda e amizade.

Aos senhores, técnicos e funcionários, Omar, Antonio e Francisco, que sempre me ajudaram durante o meu trabalho e sempre foram muito atenciosos comigo.

A funcionária do departamento, Leni e a professora Artamízia, pela eficiência de seu trabalho.

A todos os estudantes do curso de Engenharia de Pesca, que sempre me apoiaram em minhas pesquisas, durante todo o curso.

Ao CNPq, por ter me concedido uma bolsa de pesquisa.

A todos, os meus sinceros agradecimentos!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Polissacarídeos Sulfatados	1
1.2. Atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados	2
2. MATERIAIS E MÉTODOS	7
2.1. Coleta e limpeza da alga.	7
2.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados.	7
2.2.1. Método I	7
2.2.2. Método II	8
2.3. Otimização do rendimento	8
2.4. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados	11
2.5. Atividade metacromática dos polissacarídeos sulfatados.	11
2.6. Condutividade	11
2.7. Dosagem de Carboidratos totais pelo método de Dubois	11
2.8. Avaliação da atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados pelo teste do aPTT (tempo de ativação parcial da tromboplastina)	12
3. RESULTADOS	13
3.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados	13
3.2. Fracionamento e dosagem de açúcar dos polissacarídeos sulfatados	14
3.3. Avaliação da atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados pelo teste do aPTT	19

4. CONCLUSÕES	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

## RESUMO

A alga marinha vermelha *Champia feldmannii* é uma alga pertencente à Ordem Rhodymeniales, Família Lomentariaceae. O presente trabalho teve como objetivo extrair, fracionar e avaliar a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *C. feldmannii*, utilizando diferentes metodologias de extração. A extração iniciou-se a partir de 2 gramas do material seco, hidratado com tampão acetato de sódio pH 5,0 + EDTA 5mM + cys 5mM. Em seguida, adicionou-se solução de papaína (30 mg/ml), sendo a mistura incubada a 60 °C por 24 horas. Após esse período, o resíduo foi separado do sobrenadante. Ao sobrenadante adicionou-se solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CPC) para precipitação dos polissacarídeos sulfatados por 24 horas, à temperatura ambiente. Pelo método II, a precipitação foi realizada apenas com etanol absoluto. Após a precipitação, os polissacarídeos sulfatados foram levados à estufa, a 60 °C para secagem, obtendo-se os polissacarídeos totais. O extrato bruto dos polissacarídeos foi fracionado em coluna de troca iônica, com solução contendo diferentes concentrações de NaCl. Em cada fração obtida, foram realizados os testes de condutividade, DUBOIS e aPTT, para determinar a condutividade, o teor de açúcar e atividade anticoagulante, respectivamente. O rendimento total obtido pelo método II (46,6%) foi superior ao obtido pelo método I (36,2%). O fracionamento em coluna de troca iônica mostrou uma grande diferença no perfil metacromático entre os polissacarídeos sulfatados extraídos pelos métodos I e II, bem como entre as diferentes incubações dentro do mesmo método. A atividade anticoagulante apresentou uma grande variação entre os métodos e também entre as diferentes incubações de um mesmo método. As atividades mais expressivas foram obtidas nas frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de NaCl, ambas oriundas da quarta incubação do método I (C.P.C.), sendo a primeira a mais ativa. A fração eluída com 1,2 M de NaCl obtida da 2ª incubação do método II também apresentou uma atividade anticoagulante bastante expressiva.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Fluxograma de extração de polissacarídeos sulfatados pelo Método I	9
<b>Figura 2.</b> Fluxograma de extração de polissacarídeos sulfatados pelo Método II	10
<b>Figura 3.</b> Rendimento dos polissacarídeos sulfatados (g) da alga marinha vermelha <i>C. feldmannii</i> , por incubação, obtidos pelos métodos I e II	13
<b>Figura 4.</b> Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 1ª incubação da alga marinha vermelha <i>C. feldmannii</i> (Método I).	14
<b>Figura 5.</b> Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 1ª incubação da alga vermelha <i>C. feldmannii</i> (Método II).	15
<b>Figura 6.</b> Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 2ª incubação da alga marinha vermelha <i>C. feldmannii</i> (Método I).	16
<b>Figura 7.</b> Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 2ª incubação da alga marinha vermelha <i>C. feldmannii</i> (Método II).	16

- Figura 8.** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 3ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método I). 17
- Figura 9.** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 3ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método II). 17
- Figura 10.** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 4ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método I). 18
- Figura 11.** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 4ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método II). 19

**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. feldmannii</i> obtidos pelo Método I	21
<b>Tabela 2.</b> Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. feldmannii</i> obtidos pelo Método II	22

# EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA VERMELHA *Champia feldmannii*.

VALESKA MARTINS TORRES

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Hoek et al. (1995), existem cerca de 5.000 a 5.500 espécies de algas vermelhas ou Rhodophyta, que estão distribuídas entre 500 a 600 gêneros.

A alga marinha vermelha *Champia feldmannii* é uma alga pertencente à Ordem Rhodymeniales, Família Lomentariaceae. Essa família possui características como talo cilíndrico e ramificado, na maioria oco e de organização multiaxial. Suas células glandulares desenvolvidas são, geralmente, produzidas na cavidade interna. Possuem paredes celulares formadas por células grandes e pequenas. A maioria das células terminais produzem carpósporos e seus tetrasporângios são geralmente tetraédricos. As algas do gênero *Champia* crescem em tufos, epifitando outras algas. Possuem cor rósea-cárnea, translúcidas, ramos cilíndricos e segmentados (HOEK, et al., 1995; JOLY, 1965). No litoral brasileiro, há registros de sua presença em Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia e Rio de Janeiro. No Ceará, a alga *C. feldmannii* pode ser encontrada na praia do Pacheco, município de Caucaia.

### 1. 1. Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos são polímeros lineares ou ramificados, presentes em organismos vivos, animais e vegetais, desempenhando papel como reserva energética e estrutural (LEHNINGER, 1976). Neste grupo de compostos destacam-se os polissacarídeos sulfatados, principalmente os glicosaminoglicanos de tecidos animais e os vários polissacarídeos sulfatados

de algas marinhas e gramíneas marinhas. Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos constituídos de unidades alternadas de hexosamina e outro açúcar não aminado. São substâncias encontradas em altas concentrações no tecido conjuntivo, principalmente como componentes da matriz extracelular. (AQUINO et al., 2005; HEINEGARD e OLDBERG, 1989; RUOSLAHTI, 1989; HASCALL, 1988; FRANSSON, 1985; DIETRICH, 1984; LINDAHL e HOOK, 1978; LEHNINGER, 1976).

As carragenanas e o fucoidam são polissacarídeos sulfatados encontrados em algas marinhas. Estes compostos estão principalmente no espaço extracelular ou na matriz mucilaginosa de várias espécies de algas marinhas. As carragenanas são polímeros lineares constituídos de unidades alternadas de  $\beta(1\rightarrow4)$  D-galactopiranosose (unidade A) e  $\alpha(1\rightarrow3)$  galactopiranosose (unidade B), sendo que o resíduo da unidade B pode ser constituído por D- ou L- galactopiranosose. A complexidade da estrutura destes compostos decorre da presença de diferentes proporções de  $\alpha$ -D- ou L-galactopiranosose, da presença de grupamentos sulfatos nas posições 2, 4 ou 6 dos resíduos de  $\beta$ -D-galactopiranosose ou nas posições 2 e/ou 6 dos resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose e da formação de 3,6-anidro-galactose, decorrente da eliminação do sulfato da posição 6 dos resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose. O fucoidam é outro polissacarídeo abundante em algas, constituído principalmente de  $\alpha$ -L-fucopiranosose, unidas por ligação glicosídica tipo 1 $\rightarrow$ 2 e com sulfato na posição 4. Quantidades menores de outros açúcares como galactose, manose e ácido hexurônico são descritas em preparações de fucoidam (GRAHAM e WILCOX, 2000; HOEK et al., 1995; PAINTER, 1983; PERCIVAL e MCDOWELL, 1967).

## **1.2. Atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados**

Nos últimos anos, há um crescente interesse em se descobrir novos compostos biologicamente ativos extraídos de algas e outros organismos marinhos.

Os polissacarídeos sulfatados extraídos de diversas algas marinhas podem ser aplicáveis em diversas áreas, como na indústria alimentícia, onde são utilizados como emulsificantes, estabilizantes e espessantes de alimentos;

na indústria cosmética, no preparo de xampus, condicionadores e cremes para o corpo; na biotecnologia, no preparo de culturas gelatinosas e na área das ciências biomédicas (HOEK et al., 1995).

Recentemente, diversos estudos foram publicados mostrando as diferentes atividades que substâncias extraídas das algas marinhas podem apresentar. Dentre essas substâncias podemos citar os polissacarídeos sulfatados, anticoagulantes e antitrombóticos, e as proteínas denominadas lectinas que possuem atividade hemaglutinante e ação mitogênica (NAGANO et al., 2002; SAMPAIO et al., 2002; COSTA et al., 1999; FREITAS et al., 1997).

Em algas verdes (Chlorophyta) como, por exemplo, *Codium cilindricum* e *Ulva pertusa*, entre outras clorofitas, os polissacarídeos sulfatados exibiram atividade anticoagulante através da inibição de trombina (PENGZHAN, et al., 2003; MATSUBARA et al., 2001; HAYAKAWA et al., 2000). Rao et al. (2004) estudaram a natureza antihepatotóxica de um extrato aquoso quente da alga verde marinha, *Ulva reticulata*, em um experimento com ratos. Os resultados indicaram que o pré-tratamento oral de ratos com o extrato de *U. reticulata* é efetivo, reduzindo radicalmente a tensão oxidativa hepática, sugerindo uma atividade de antihepatotóxica. Recentemente, Rodrigues (2004) isolou uma fração de um polissacarídeo sulfatado, extraído na quarta incubação da alga verde *Caulerpa racemosa*, que apresentou significativa atividade anticoagulante, prolongando o tempo de formação do coágulo em até seis vezes em relação ao tempo normal de coagulação.

Segundo Zhang et al. (2003), uma fração de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) apresentou atividade antioxidante "in vivo", quando administrada por injeção intraperitoneal, reduzindo o nível de peroxidação lipídica. Nesse mesmo trabalho, o autor sugere que esses polissacarídeos sulfatados possuem ação imunoestimulante, pois a aplicação da fração de polissacarídeo induziu um aumento no índice de baço e timo, órgãos responsáveis pela produção dos linfócitos que protegem o organismo. Um polissacarídeo sulfatado de baixo peso molecular, obtido da alga marinha *Laminaria japonica* também apresentou efeito antioxidante, além de um efeito hepato-protetor, quando administrados em ratos vivos (ZHAO et al., 2004; XUE et al., 2001).

As galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata* apresentaram atividade antiviral contra o vírus do herpes simplex tipo I e II. Após os tratamentos com as galactanas sulfatadas, observou-se um efeito inibitório na adsorção do vírus, havendo proteção significativa contra o vírus do herpes simplex, em vagina de roedores (TALARICO et al., 2004). A atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados dessas algas também foi analisada contra quatro sorotipos de vírus da dengue, onde foram observadas variações nas atividades antivirais dos polissacarídeos no tocante à interação vírus-célula, que conduz a entrada do vírus (TALARICO et al., 2005). Ainda em relação à atividade antiviral, os polissacarídeos sulfatados da alga *Gracilaria corticata* exibiram potente efeito inibitório contra o vírus do herpes simplex dos tipos I e II, sendo considerados potenciais candidatos para combater esse tipo de vírus (MAZUMDER et al., 2002).

As galactanas sulfatadas, obtidas da alga vermelha *Bostrychia montagnei*, exibiram atividade antiviral inibindo a replicação do vírus do herpes simplex tipos I e II. A avaliação do tempo de ativação parcial da tromboplastina (aPTT) dos polissacarídeos sulfatados extraídos de *Bostrychia montagnei* revelou uma baixa atividade anticoagulante (DUARTE et al. 2001). Os autores sugerem ainda, a partir desses resultados, que não há nenhuma relação entre as propriedades antivirais e anticoagulantes desses polissacarídeos.

Muitos polissacarídeos não sulfatados têm apresentado um efeito imunoestimulante quando administrados às larvas de peixes e camarões (MILES et al., 2001; VARGAS-ALBORES e YEPIZ-PLASCENCIA, 2000; SAKAI, 1999; PARK e DO JEONG, 1996;).

Campa-Córdova et al. (2002) relataram, pela primeira vez, a atividade imunoestimulante em juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei*, através da imersão dos mesmos em solução de um polissacarídeo sulfatado extraído da microalga *Cyanotheca* sp. E, segundo os autores, esta atividade foi 500 vezes mais potente do que a observada para um polissacarídeo não sulfatado. Os polissacarídeos sulfatados da macroalga vermelha marinha *Botryocladia occidentalis* foram incorporados em ração para larvas de tilápias, sendo observado um crescimento bastante diferenciado nas larvas que receberam determinada dose do polissacarídeo (FARIAS et al., 2004). Recentemente, quando os polissacarídeos sulfatados de *B. occidentalis* foram utilizados em

banhos de imersão em pós-larvas de *L. vannamei*, os camarões apresentaram, em uma determinada dose, uma melhoria na sobrevivência (FARIAS, com.pess.) Um efeito de aceleração no crescimento e/ou aumento na sobrevivência têm sido relatados como efeitos adicionais da imunestimulação (SAKAI, 1999).

Dentre todas as atividades biológicas relatadas para os polissacarídeos sulfatados de algas e outros organismos marinhos, os estudos se concentram, principalmente, nas atividades anticoagulante e antitrombótica. Farias et al. (2000) purificou e caracterizou a estrutura de uma galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*. Esta D-galactana sulfatada possui uma elevada atividade anticoagulante (semelhante à heparina) determinada pela presença de dois ésteres de sulfato em um único resíduo de galactose (FARIAS et al., 2000). O mecanismo desta atividade anticoagulante ocorre através da potencialização da inibição da trombina via antitrombina e cofator II da heparina. Esta galactana sulfatada 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).

A atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga parda *Fucus evanescens* é realizada através da inibição de trombina, mediada por antitrombina III (KUZNETSOVA et al., 2003). Uma fração de polissacarídeo sulfatado de outra espécie de *Fucus*, *F. vesiculosus*, mostrou alto potencial antioxidante (RUPEREZ et al., 2002). O fucoidam, um polissacarídeo sulfatado dessa mesma espécie, inibiu eficazmente as toxinas presentes em veneno de cobra, quando administrado em ratos (ANGULO e LOMONTE, 2003). A partir do extrato da alga marrom *Sargassum patens* foi possível o isolamento de um polissacarídeo com atividade contra o vírus do herpes simples (HSV-1) e do herpes genital (HSV-2) (ZHU et al., 2003).

Em relação a outros organismos, foi observada uma elevada atividade anticoagulante no condroitim sulfato do pepino-do-mar devido à sua capacidade de potencializar a inibição da trombina e do fator Xa pela antitrombina ou cofator II da heparina. Através de modificações químicas neste polímero, ficou evidente que esta atividade anticoagulante é devida, principalmente, às ramificações de fucose sulfatadas ligadas à região central

da molécula de condroitim sulfato. A atividade antitrombótica deste polissacarídeo também 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 (MOURÃO et al., 1998; MOURÃO et al., 1996). Pereira et al., (2002), estudou as características estruturais de galactanas e fucanas sulfatadas obtidas de invertebrados marinhos. Os resultados indicaram que as exigências estruturais para interação de galactanas e fucanas sulfatadas com os co-fatores de coagulação são específicas e não somente uma consequência da sua densidade de carga e conteúdo de sulfato.

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

O presente trabalho teve como objetivo extrair e avaliar o rendimento dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Champia feldmannii*, utilizando diferentes metodologias de precipitação, bem como fracionar e avaliar a atividade anticoagulante nas frações obtidas desses polímeros.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta e limpeza da alga.**

A alga marinha vermelha *Champia feldmannii* foi coletada na Praia do Pacheco, Município de Caucaia - Ceará, durante as marés mais baixas. Em seguida, a mesma foi transportada em saco plástico até o laboratório, sendo cuidadosamente separada das epífitas e lavada com água destilada para a retirada de impurezas. Após a limpeza, a alga foi desidratada à luz solar e cortada em pequenos pedaços para, posteriormente, ser submetida ao processo de extração.

### **2.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados.**

Foram utilizadas duas metodologias de extração. No Método I, de acordo com Farias (2000), a precipitação dos polissacarídeos sulfatados foi feita com uma solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CPC) e etanol absoluto e, no Método II, foi utilizado apenas etanol absoluto para precipitar os polissacarídeos sulfatados (ARAUJO, 2003).

#### **2.2.1. Método I.**

A extração foi realizada a partir de 2 (dois) gramas do tecido seco, previamente cortado e hidratado com 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 + EDTA 5mM + cisteína 5mM. Em seguida, foram adicionados 6,8 mL de uma solução de papaína (30 mg/mL), sendo a mistura incubada a 60 °C por 24 horas.

Após esse período, a mistura foi filtrada e centrifugada (14.000 rpm; 20 min; 4 °C), separando-se o resíduo do sobrenadante. Ao sobrenadante, foram adicionados 6,4 mL de solução de CPC 10% para precipitar os polissacarídeos sulfatados por 24 horas, à temperatura ambiente. Após a precipitação, os polissacarídeos sulfatados foram centrifugados, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 200 mL de CPC 0,05% e,

posteriormente, dissolvido em 70 mL de uma solução de NaCl 2M:etanol (100:15;v:v). Em seguida, os polissacarídeos foram novamente precipitados com a adição de 122 mL de etanol absoluto, por 24 horas a 4°C.

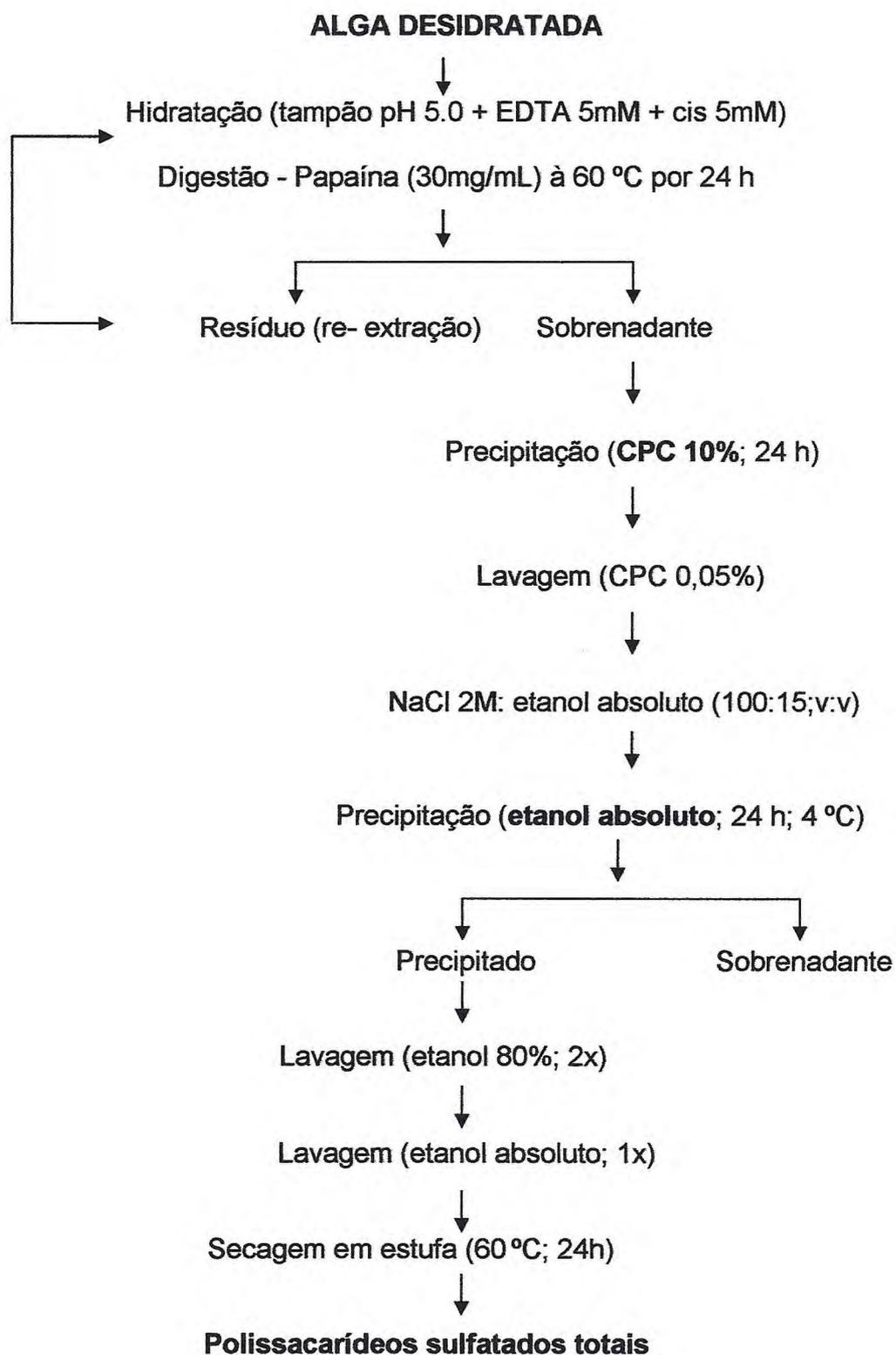
Finalmente, os polissacarídeos sulfatados foram lavados duas vezes com 200 mL de etanol 80% e uma vez com 122 mL de etanol absoluto, sendo levados à estufa a 60 °C para secagem, obtendo-se os polissacarídeos sulfatados totais (Figura 1).

### **2.2.2. Método II.**

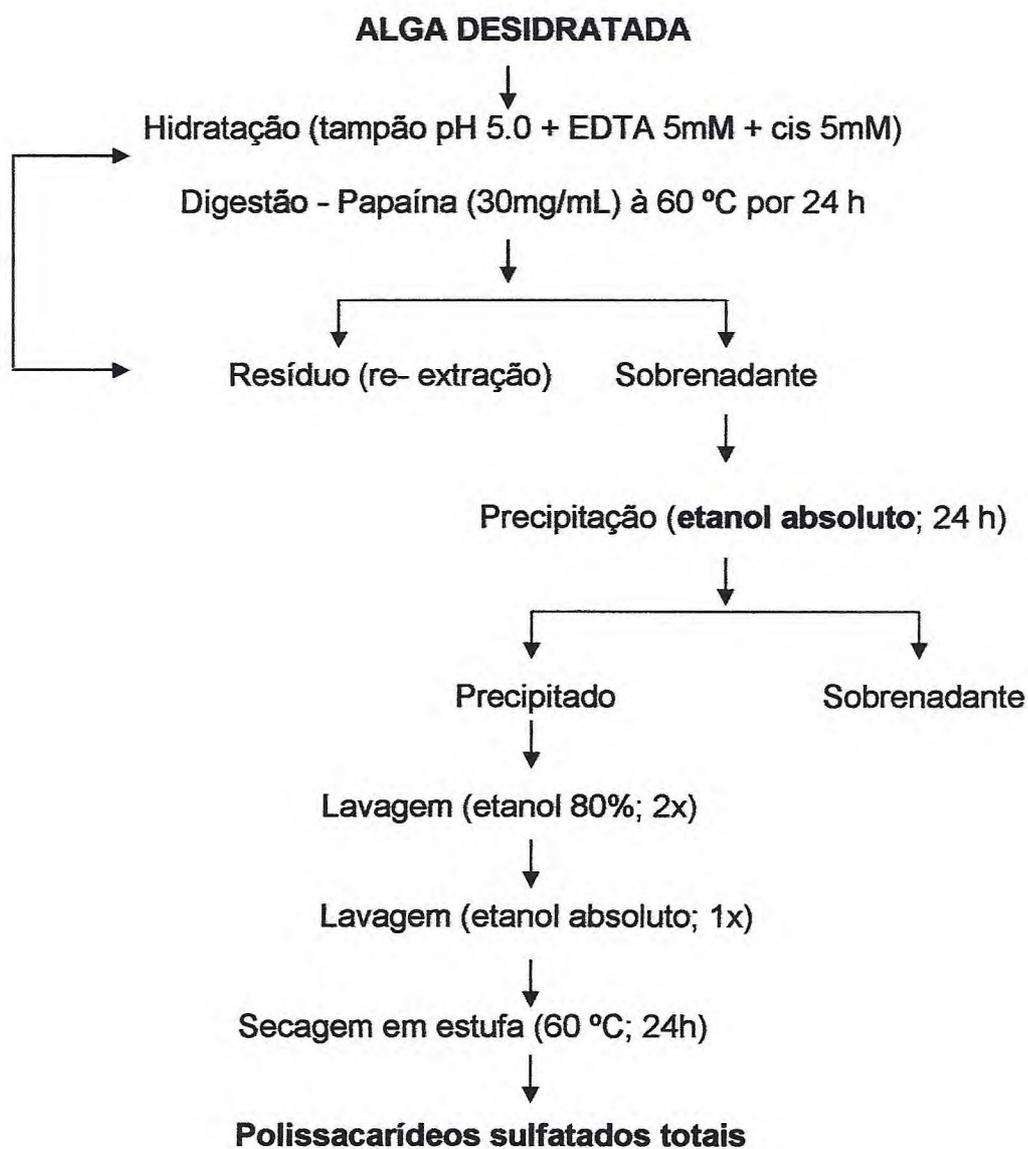
Essa extração também foi realizada a partir de 2 (dois) gramas de material seco e cortado, hidratado com tampão acetato de sódio pH 5,0 + EDTA 5mM + cisteína 5mM, sendo adicionada uma solução de papaína (30 mg/mL) e incubada a mistura a 60 °C por 24 horas. Após esse período, a mistura foi filtrada e centrifugada, separando-se o resíduo do sobrenadante. Ao sobrenadante, foram adicionados três volumes de etanol absoluto gelado para precipitar os polissacarídeos sulfatados por 24 horas. Após esse tempo de precipitação, os polissacarídeos sulfatados foram submetidos a duas lavagens com etanol 80% e uma com etanol absoluto sendo, em seguida, levados a estufa a 60 °C para secagem, obtendo-se os polissacarídeos sulfatados totais (Figura 2).

### **2.3. Otimização do rendimento.**

A otimização do rendimento foi realizada a partir do resíduo da primeira incubação, submetendo-o a novas extrações, seguindo o mesmo processo para os Métodos I e II.



**Figura 1:** Fluxograma de extração de polissacarídeos sulfatados pelo Método I



**Figura 2:** Fluxograma de extração de polissacarídeos sulfatados pelo Método II

#### **2.4. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados.**

O extrato bruto foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com o tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 + EDTA 5mM + cisteína 5mM e o fluxo foi mantido em 60mL/h. Em todas as cromatografias, foi aplicada uma amostra de 1 mL de uma solução contendo 1 mg/mL de extrato bruto de polissacarídeos. 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).

#### **2.5. Atividade metacromática dos polissacarídeos sulfatados.**

O monitoramento da atividade metacromática foi realizado adicionando-se 200  $\mu$ L de cada fração obtida durante a eluição da coluna de DEAE-celulose a 1mL de azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB), que é um indicador específico para grupos sulfatados, mudando sua coloração na presença do polissacarídeo sulfatado. Essa atividade foi determinada no espectrofotômetro, através da leitura da absorbância a 525 nm.

#### **2.6. Condutividade**

A condutividade foi analisada misturando-se 120  $\mu$ L de cada fração obtida na coluna de troca iônica, a 12 mL de água destilada, sendo determinada em um condutivímetro (ANALYSER – Condutivímetro 650) e expressa em microSiemens (microMHO).

#### **2.7. Dosagem de Carboidratos totais pelo método de Dubois.**

A determinação dos carboidratos totais foi realizada pelo método de Dubois et al. (1956). Inicialmente, 50  $\mu$ L de solução de polissacarídeo sulfatado eluída com cloreto de sódio foram adicionados a 350  $\mu$ L água destilada. Em seguida, 20  $\mu$ L de fenol 5% redestilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado,

foram misturados, permanecendo em repouso por 30 minutos. Após esse período, o teor de açúcar foi determinado no espectrofotômetro através da leitura da absorbância a 490 nm.

## **2.8. Avaliação da atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados pelo teste do aPTT (tempo de ativação parcial da tromboplastina).**

A atividade anticoagulante foi avaliada utilizando amostras de sangue humano citratado, proveniente de cinco doadores diferentes, sendo centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, para a obtenção de um plasma humano pobre em plaquetas.

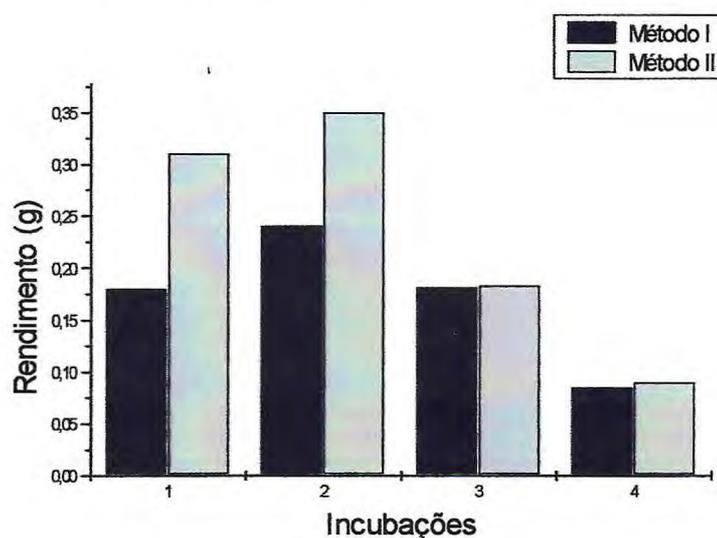
Para a realização do teste, foram utilizados 50  $\mu$ L de plasma humano, 50  $\mu$ L de cefalina ativada e 5  $\mu$ L de solução de polissacarídeo sulfatado. A mistura foi incubada por 3 minutos a 37°C e, após o período de incubação, foram adicionados 50  $\mu$ L de cloreto de cálcio 0,025 M, para ativar a "cascata" de coagulação, sendo o tempo de coagulação registrado por um coagulômetro (Drake - Quick Timer).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados.

Os resultados obtidos mostraram que é possível extrair uma quantidade razoável de polissacarídeos em até quatro incubações, utilizando o mesmo resíduo, para ambos os métodos de extração (Figura 3). Entre as incubações, observou-se um maior rendimento na segunda incubação, decrescendo na terceira e quarta incubações, nos dois métodos de extração.

O Método II apresentou um rendimento total (quatro incubações) de 46,6 %, sendo superior ao rendimento total obtido pelo Método I (36,2 %). O primeiro método apresentou um rendimento ligeiramente superior ao da alga *Gracilaria cornea*, com 21,4% (MELO et al., 2002). Os Métodos I e II mostraram resultados mais significativos do que os obtidos pelos mesmos métodos de extração das algas *Gracilaria sjoestedtii*, onde foram obtidos 31,5 e 32,3 % do extrato bruto de polissacarídeo sulfatado (ARAUJO, 2003) e *Caulerpa racemosa*, cujos rendimentos foram da ordem de 26 e 31,5%, respectivamente (ROGRIGUES, 2004).

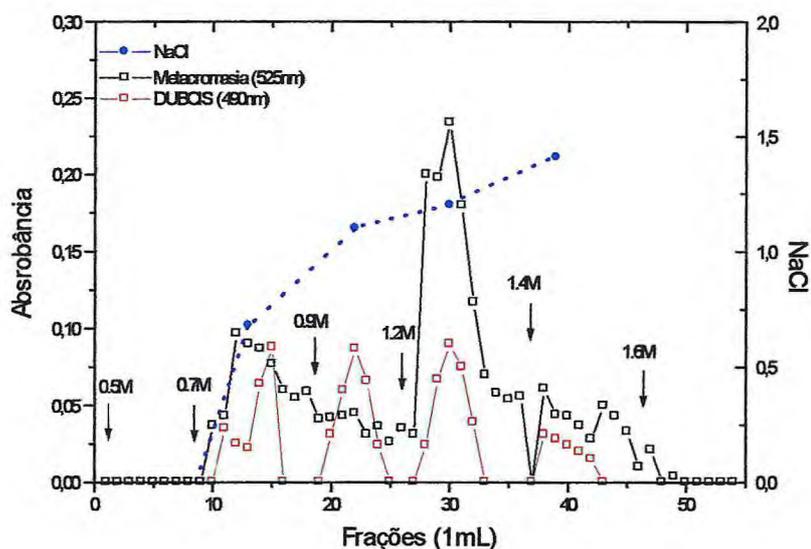


**Figura 3:** Rendimento dos polissacarídeos sulfatados (g) da alga marinha vermelha *C. feldmannii*, por incubação, obtidos pelos métodos I e II.

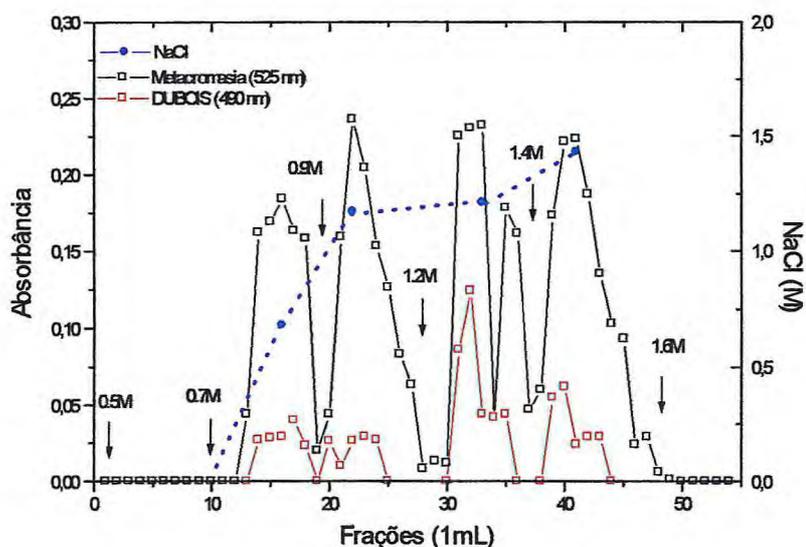
### 3.2. Fracionamento e dosagem de açúcar dos polissacarídeos sulfatados.

Após o fracionamento dos polissacarídeos sulfatados da alga *C. feldmannii* em DEAE-celulose, observou-se que em todas as incubações de ambos os métodos, os mesmos foram eluídos nas concentrações de 0,7, 0,9, 1,2 e 1,4M de NaCl.

As cromatografias apresentaram diferentes perfis metacromáticos, que variaram de acordo com a incubação e o método de extração utilizado. Na primeira incubação do Método I, a cromatografia revelou uma fração com uma elevada metacromasia, que foi eluída com 1,2 M de NaCl (Figura 4), enquanto que, na primeira incubação do Método II, as quatro frações apresentaram atividades metacromáticas elevadas e bastante semelhantes (Figura 5). Quando foi analisado o teor de açúcar nas referidas frações, observou-se que, no Método I, esses teores foram bastante semelhantes com exceção da última fração (1,4 M de NaCl) que apresentou o menor teor (Figura 4). Por outro lado, no Método II, as frações eluídas com 0,7 e 0,9 M de NaCl apresentaram os menores teores de açúcar, enquanto que as frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de NaCl apresentaram teores de açúcar superiores, sendo maior na fração eluída com 1,2 M de NaCl (Figura 5).

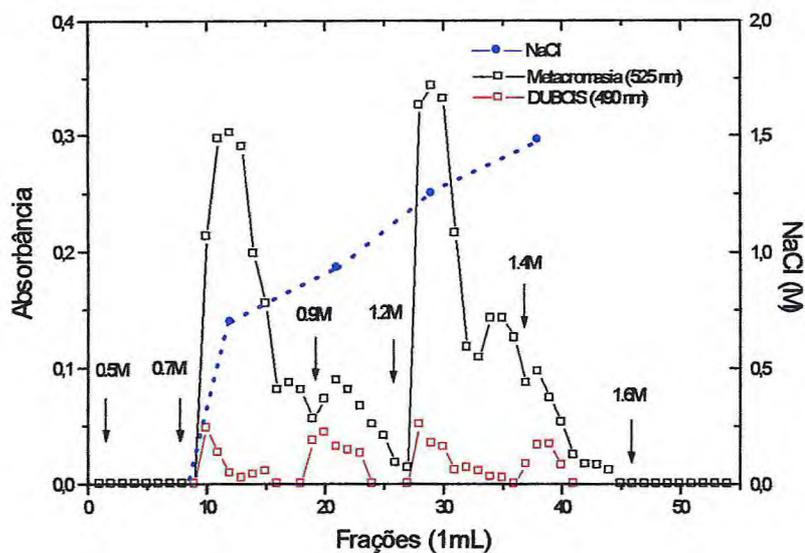


**Figura 4:** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 1ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método I).

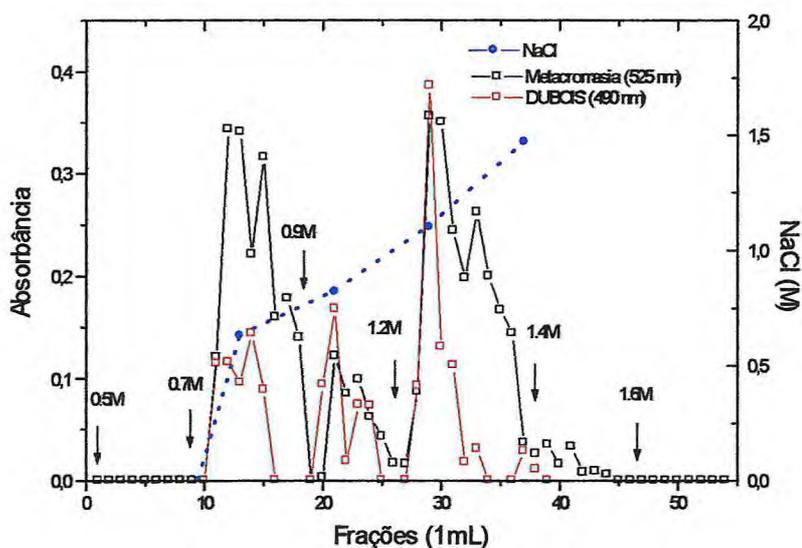


**Figura 5:** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 1ª incubação da alga vermelha *C. feldmannii* (Método II).

Os perfis metacromáticos da segunda incubação obtidos pelos Métodos I e II são semelhantes (Figuras 6 e 7), observando-se duas frações majoritárias eluídas com 0,7 e 1,2M de NaCl. O teste de Dubois revelou uma presença de açúcar bastante semelhante entre as quatro frações obtidas através do método I (Figura 6). Ao contrário, no Método II, foram observadas presença de açúcar bem superiores às do Método I nas frações eluídas com 0,7, 0,9 e 1,2 M de NaCl (Figura 7).



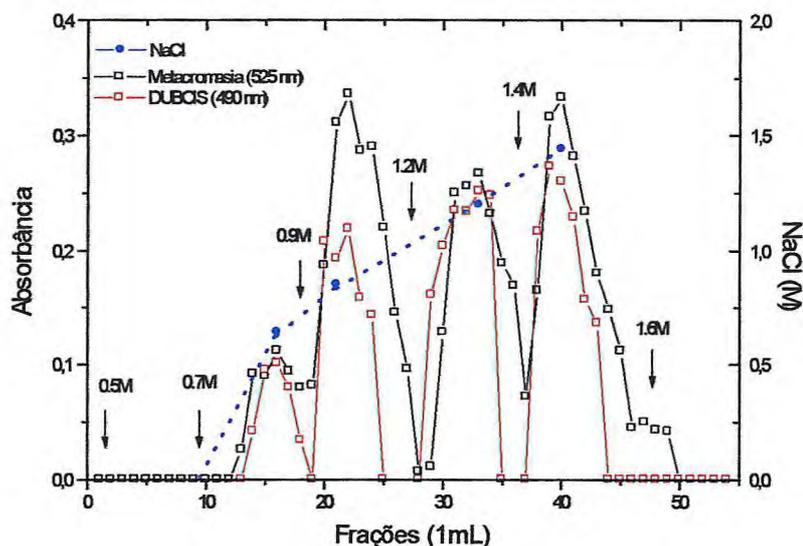
**Figura 6:** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 2ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método I).



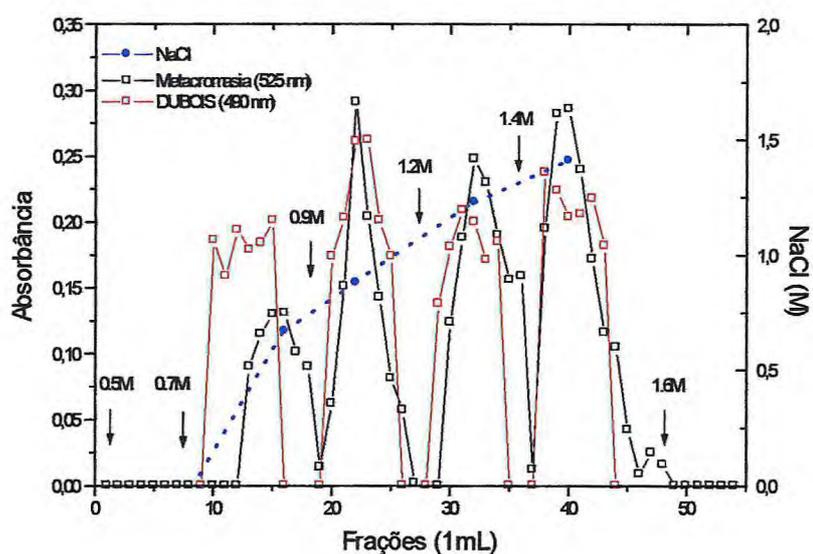
**Figura 7:** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 2ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método II).

O perfil metacromático da terceira incubação do Método I (Figura 8) se mostrou semelhante ao perfil da mesma incubação do Método II (Figura 9). No entanto, nesses perfis as frações majoritárias foram eluídas com 0,9 e 1,4 M de

NaCl, diferindo dos obtidos nas incubações anteriores. As frações obtidas através do Método I apresentaram teores de açúcar crescentes, sendo a fração eluída com 0,7 M de NaCl a de menor teor (Figura 8). Já, no Método II, as frações eluídas com 0,9 e 1,4 M de NaCl apresentaram teores de açúcar superiores às demais (Figura 9).

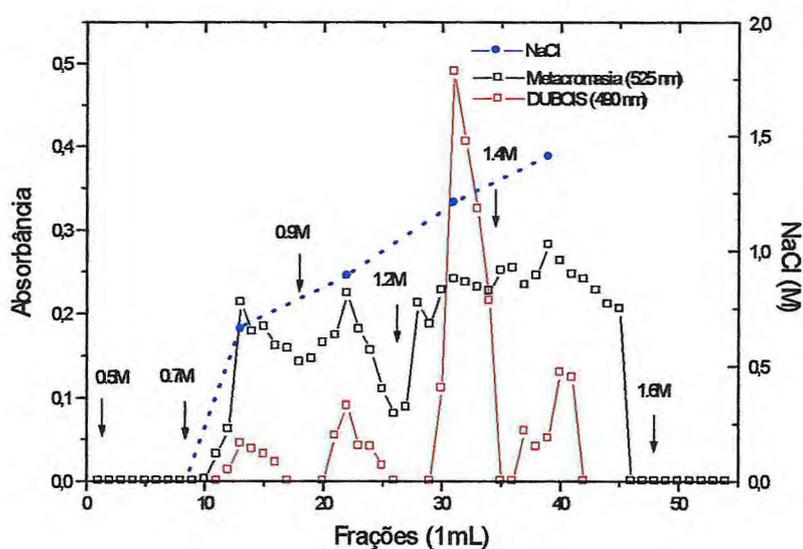


**Figura 8:** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 3ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método I).

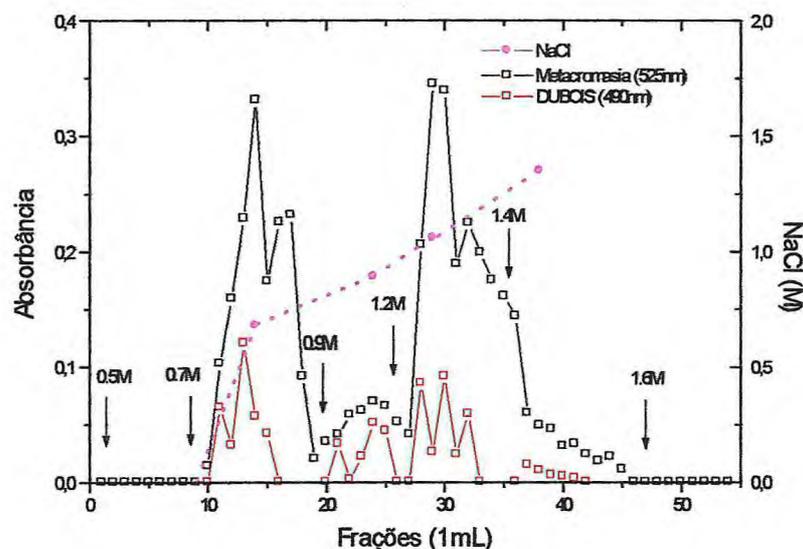


**Figura 9:** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 3ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método II).

Em relação à quarta incubação do Método I (Figura 10), as frações apresentaram uma atividade metacromática bastante semelhante, enquanto que, na quarta incubação do Método II (Figura 11), apenas duas frações apresentaram atividade metacromática significativa (0,7 e 1,2M de NaCl). Com relação aos teores de açúcar, no Método I, a fração eluída com 1,2 M de NaCl apresentou cerca de 5 vezes mais açúcar do que as demais frações (Figura 10). Diferentemente, no Método II os teores de açúcar foram bastante reduzidos e bem semelhantes entre as quatro frações (Figura 11).



**Figura 10:** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 4ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método I).



**Figura 11:** Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas da 4ª incubação da alga marinha vermelha *C. feldmannii* (Método II).

### 3.3. Avaliação da atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados pelo teste do aPTT .

O teste do aPTT foi realizado nas frações obtidas das quatro incubações dos Métodos I e II. No Método I, com exceção das frações obtidas com 1,4M de NaCl da 1ª incubação e 0,9M de NaCl da 2ª incubação, a atividade anticoagulante esteve presente, em diferentes intensidades, em todas as frações. A maioria das frações apresentou uma baixa atividade anticoagulante (Tabela 1), com o prolongamento do tempo de coagulação normal (37,5s) variando entre 1,1 a 2 vezes. As frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de NaCl oriundas, respectivamente, das 1ª e 3ª incubações prolongaram em cerca de 3 vezes o tempo de coagulação normal. Na quarta incubação desse método, as frações eluídas com 1,4M e 1,2M de NaCl apresentaram as atividades mais expressivas. A primeira fração (1,4 M de NaCl) aumentou o tempo de coagulação em 4,8 vezes, enquanto a atividade da segunda fração (1,2 M de NaCl) não pôde ser mensurada, pois ela ultrapassou o tempo de registro do coagulômetro, que é de 240 segundos, prolongando, no mínimo, em 6,4 vezes

o tempo de coagulação. Desta forma, essa fração foi a que apresentou a atividade anticoagulante mais elevada. Surpreendentemente, essa fração teve sua atividade significativamente amplificada na 4ª incubação, provavelmente pela maior presença de açúcar (Figura 10), já que a metacromasia foi praticamente a mesma obtida na 1ª incubação (Figura 4). Desta forma, de alguma maneira, os polissacarídeos dessa fração foram extraídos em uma maior quantidade na última incubação, possivelmente por estarem mais acessíveis ao ataque enzimático. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Rodrigues (2004), que descreveu um aumento significativo da atividade anticoagulante em 2 frações, eluídas durante a quarta incubação, oriundas da macroalga verde *Caulerpa racemosa*.

No Método II, com exceção da fração obtida com 0,7M de NaCl da 3ª incubação, a atividade anticoagulante (Tabela 2) esteve presente, em baixa intensidade, em todas as frações, prolongando o tempo de coagulação normal (36,4 s) entre 1,2 a 2,3 vezes. O resultado mais significativo foi obtido com a fração eluída com 1,2M de NaCl oriunda da 2ª incubação, cujo tempo de coagulação foi prolongado em 4,2 vezes em relação ao controle. Mais uma vez, observamos uma amplificação da atividade anticoagulante dessa fração, desta vez, da 1ª para a 2ª incubação. Esta fração teve sua metacromasia e teor de açúcar aumentados da 1ª (Figura 5) para a 2ª incubação (Figura 7) o que, provavelmente, resultou na elevação dessa atividade.

O controle positivo, realizado com 1 µL de heparina (5.000 UI/mL), também ultrapassou a capacidade de registro de tempo do coagulômetro. Quando o teste foi realizado com 1 µL da fração mais ativa, novamente, o tempo de formação do coagulo foi superior à leitura do coagulômetro. Esses resultados sugerem que, a fração eluída com 1,2M de NaCl, obtida da quarta incubação do Método I, pode apresentar uma atividade anticoagulante semelhante à da heparina não-fracionada.

Todos os trabalhos envolvendo extração e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados, seja de algas ou de invertebrados marinhos utilizaram amostras oriundas de uma única extração ou, em algumas vezes, reuniram amostras de duas ou três extrações, não avaliando se existia diferenças na atividade anticoagulante entre frações oriundas de diferentes extrações. Este trabalho mostra, claramente, que é possível obter moléculas

com atividade anticoagulante bastante elevada, realizando várias extrações de um mesmo resíduo. A futura elucidação dos mecanismos envolvidos nessa atividade, bem como os aspectos estruturais desses polissacarídeos poderão explicar, definitivamente, a amplificação da atividade anticoagulante observada nessas frações.

**Tabela 1:** Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados de *C. feldmannii* obtidos pelo Método I.

Método I	Fração (M)	Tempo de coagulação (s)	aPTT ( $T_1/T_0$ )
1ª incubação	0,7	58,1	1,6
	0,9	41,6	1,1
	1,2	114,0	3,0
	1,4	24,3	0,7
2ª incubação	0,7	43,0	1,2
	0,9	27,8	0,7
	1,2	69,4	1,8
	1,4	44,1	1,2
3ª incubação	0,7	49,4	1,3
	0,9	75,4	2,0
	1,2	66,1	1,8
	1,4	106,0	2,8
4ª incubação	0,7	52,7	1,4
	0,9	48,4	1,3
	1,2	> 240	> 6,4
	1,4	178	4,8

**Tabela 2:** Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados de *C. feldmannii* obtidos pelo Método II.

Método II	Fração (M)	Tempo de coagulação (s)	aPTT ( $T_1/T_0$ )
1ª incubação	0,7	48,1	1,2
	0,9	64,6	1,8
	1,2	81,8	2,3
	1,4	70,4	1,9
2ª incubação	0,7	63,5	1,8
	0,9	41,6	1,2
	1,2	152,0	4,2
	1,4	49,3	1,4
3ª incubação	0,7	36,3	1,0
	0,9	69,5	1,9
	1,2	71,6	2,0
	1,4	78,5	2,2
4ª incubação	0,7	57,0	1,6
	0,9	46,6	1,3
	1,2	71,8	2,0
	1,4	48,1	1,3

#### 4. CONCLUSÕES

Após a realização do presente trabalho, pode-se concluir que:

- 1) Podem ser realizadas até quatro extrações, utilizando o mesmo resíduo, para a obtenção de quantidades significantes de polissacarídeos por ambos os métodos;
- 2) O Método II apresentou um maior rendimento total (46,6 %) de polissacarídeos quando comparado ao Método I (36,2 %), sendo mais efetivo na obtenção dessas moléculas;
- 3) O fracionamento em coluna de troca iônica mostrou uma grande diferença no perfil metacromático entre os polissacarídeos sulfatados extraídos pelos Métodos I e II, bem como entre as diferentes incubações dentro do mesmo método;
- 4) A atividade anticoagulante apresentou uma grande variação entre os métodos e também entre as diferentes incubações de um mesmo método. As atividades mais expressivas foram obtidas nas frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de NaCl, ambas oriundas da quarta incubação do Método I (C.P.C.), sendo a primeira a mais ativa. A fração eluída com 1,2 M de NaCl obtida da 2ª incubação do Método II também apresentou uma atividade anticoagulante bastante expressiva.
- 5) De forma geral, o método de extração I é o mais aconselhável para a obtenção dos polissacarídeos sulfatados que apresentam significativa atividade anticoagulante.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A(2). *Biochemical Pharmacology* 66 (10): 1993-2000, 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*, 15: 11-20, 2005.

ARAÚJO, G. S.; Ensaio preliminar sobre o cultivo e extração de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria sjoestedtii*. Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, p 9-16, 2003.

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

COSTA, F.H.F.; SAMPAIO, A. H.; NEVES, S.A.; ROCHA, M.L.A.; BENEVIDES, N.M.B.; FREITAS, A.L.P. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 5: 53-61, 1999.

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*, 86: 677-683, 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.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-354, 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, 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*, Vol. 86, N° 6: 1540-1546, 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*, Vol. 35, N° especial: 198-195, 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. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275., N°88., 29299 a 29307, 2000.

FRANSSON, L.A. *The Polyssacarides* Vol. 111, pp. 337-415, Academic Press., N.Y., 1985.

FREITAS, A. L. P., TEIXEIRA, D. I. A., COSTA, F. H. F., FARIAS, W. R. L., LOBATO, A. S. C., SAMPAIO, A. H., BENEVIDES, N. M. B. A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. *Journal of Applied Phycology*. Bélgica: , 9: 495 - 501, 1997.

GRAHAM, L.; WILCOX, L. W.; *Algae*. Prentice-Hall do Brasil LTDA, p. 74-75, 2000.

HASCALL, V. S. *Atlas Sci. Biochem.* 1: 184-198, 1988

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J. B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N.; Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543: 86-94, 2000.

HEINEGARD, O. E. OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB. J.* 3: 2042-2051, 1989.

HOEK, C. van den; MANN, D. G. e JAHNS, H. M. *Algae: an introduction to phycology*, Cambridge University Press, p. 48, 62, 91, 513-527, 1995.

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

KUZNETSOVA, T. A.; BESEDNOVA, N. N.; MAMAEV, A. N.; MOMOT, A. P.; SHEVCHENKO, N. M.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk Sea. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 136 (5): 471-473, 2003

LEHNINGER, A. L. *Bioquímica: volume 1 – Componentes Moleculares da Célula*, 2ª edição, Editora Edgard Bliicher LTDA: 179-182, 1976.

LINDAHL, U. and HOOK, M.; Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Ann Rev Biochem.* 47:385-417. 1978.

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*; 28: 395-399, 2001

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

MELO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; de PAULA, R. C. M.; Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate polymers*; 49: 491-498, 2002.

MILES, D.J.C.; POLCHANA, J.; LILEY, J.H.; KANCHANAKHAN, S.; THOMPSON, K.D.; ADAMS, A. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture* 195: 1-15, 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*, 101: 647-652, 1998.

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 sulfate from echinoderm: sulfated fucose branches on the polysaccharide accounts for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 23973-23984, 1996.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH Jr, C.; PRATES, M. V.; CALVETE, J. J.; SAMPAIO, S. S.; FARIAS, W. R. L.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. *Protein and Peptide Letters*, Vol 9, No. 2, pp, 159-165, 2002.

PAINTER, T.J. *The Polysaccharides*. Vol. II, pp. 192-285, Academic Press. N. Y., 1983.

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

PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L.; Antihyperlipidemic effects of different molecular weight

sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacological Research*, 48: 543–549, 2003.

PERCIVAL, E., MACDOWELL, R.H. *Chemistry and enzymology of Marine Algal Polysaccharides*, Academic Press, ED., N.Y., 1967.

PEREIRA, M. S.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S.; Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology* 12 (10): 573-580, 2002.

RAO, H. B. R.; SATHIVEL, A.; DEVAKI, T.; Antihepatotoxic nature of *Ulva reticulata* (chlorophyceae) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental rats. *Journal of Medicinal Food* 7 (4): 495-497, 2004.

ROGRIGUES, J. A. G.; Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (CHLOROPHYTA, CAULERPALES). Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, p 14-20, 2004.

RUOSLAHTI, E.; Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* 264: 13369-13372, 1989.

RUPEREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J. A.; Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (4): 840-845, 2002.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63-92, 1999.

SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; FARIAS, W.R.L. New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. *Journal of Applied Phycology* 14: 489-495, 2002.

TALARICO, L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FAR´YA, P.C.S.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, 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* 66: 103-110, 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 *Cryptonemia crenulata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34: 63–71, 2004.

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

XUE, C. H.; FANG, Y.; LIN, H.; CHEN, L.; LI, Z. J.; DENG, D.; LU, C. X.; Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology* 13 (1): 67-70, 2001.

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

ZHAO, X.; XUE, C. H.; LI, Z. J.; CAI, Y. P.; LIU, H. Y.; QI, H. T.; Antioxidant and hepatoprotective activities of low molecular weight sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology* 16 (2): 111-115, 2004

ZHU, W.; OOI, V. E. C.; CHAN, P. K. S.; ANG, P. O.; Isolation and characterization of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* and determination of its anti-herpes activity. *Biochemistry and Cell Biology-biochimie et Biologie Cellulaire* 81 (1): 25-33, 2003.