



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

**EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE  
ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS  
DA ALGA MARINHA VERDE *Caulerpa racemosa* (CHLOROPHYTA,  
CAULERPALES).**

**JOSÉ ARIÉVILO GURGEL RODRIGUES**

---

**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 – JULHO/2004**

2004/2

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)

---

R613e Rodrigues, José Ariévil Gurgel.  
Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Chlorophyta, Caulerpales) / José Ariévil Gurgel Rodrigues. – 2004.  
32 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2004.  
Orientação: Profa. Dra. Silvana Saker Sampaio.

1. Algas marinhas. I. Título.

CDD 639.2

---

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof(a). Silvana Saker Sampaio, Ph.D.**

**MEMBRO**

---

**Prof. Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.**

**MEMBRO**

---

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

**PRESIDENTE**

**VISTO:**

---

**Prof(a). Artamízia Maria Nogueira Montezuma, M.Sc**

**Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca**

---

**Prof. José Wilson Calíope de Freitas, D. Sc.**

**Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca**

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãs que, mesmo sem compreenderem a razão da minha escolha profissional, nunca me abandonaram quando necessitei de algum pedido. Ofereço também a memória de minha avó, Maria de Lourdes, a qual me prestou apoio moral pela profissão e que hoje não está mais presente. E as minhas tias, Assunção e Dejamira, por uma grande realização. A batalha foi difícil, entretanto, mais águas ainda irão rolar, pois esta, foi apenas mais uma etapa da minha vida.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo seu companheirismo nos momentos de alegrias e de tristezas em que passei, pois sem dúvida alguma, foi fundamental nesta minha caminhada ao ramo profissional que escolhi e por mais estradas que percorrerei ainda nesta vida;

Aos meus pais e irmãs, que mesmo sem compreenderem do porquê e motivo que me levou a decidir por esta profissão, nunca me deixaram faltar o pão e o poder aquisitivo para ocupar uma cadeira em uma sala de aula nesta instituição de ensino superior;

A minha avó, que infelizmente não teve a oportunidade de presenciar a minha formatura, eis aqui as minhas honras por ter sido o seu neto e pelo conforto quando me recebia em seu sítio, o seu lar;

As minhas tias, Assunção e Dejamira, que me ajudaram a conquistar a realização de um grande sonho;

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Wladimir, pela sua paciência, honestidade, companheirismo, atenção e amor pela área para quem também escolheu como fruto de seu esforço, os meus sinceros e louváveis agradecimentos;

Aos professores e amigos que estimo, respeito e admiro, Silvana e Alexandre, pela compreensão e atenção nos momentos quando necessitei de alguma ajuda, muito obrigado!

Também, os meus agradecimentos ao grupo GEAMAR, aos estudantes de graduação e parceiros do Laboratório de Bioquímica Marinha do DEP, em especial Valeska, José Tarcísio e Grazielle, pelo tempo disponível quando me ofereceram as suas ajudas neste trabalho, além também, de suas amigadas;

Aos senhores, funcionários e técnico, Henrique, Edilson, Antônio, Francisco e Zacarias, e senhoras e professoras, Leni, Artamízia, Selma e Alessandra, o meu muito obrigado pela franqueza, amizade, atenção e esforços para comigo quando precisei de algum conforto;

Ao meu companheiro Engenheiro. de Pesca e técnico da estação de Piscicultura Prof. Raimundo Saraiva da Costa, Jonas Lopes, pela sua grande dedicação e disponibilidade ao meu trabalho no momento inicial;

Ao PET, Programa Especial de Treinamento, pela concessão de bolsa durante o período de três anos e quatro meses, com o qual obtive a realização de grandes conquistas e premiações que jamais imaginei que algum dia tais pudessem acontecer. Sinto-me honrado de ter sido integrante do Programa que colaborou, e muito, para a minha formação como estudante, profissional e, principalmente, como cidadão de caráter;

A todos, o meu muito obrigado!

**SUMÁRIO**

	Página
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	vi
RESUMO	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. A alga marinha verde <i>Caulerpa racemosa</i>	2
1.2. Os polissacarídeos sulfatados	3
1.3. Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados	4
1.3.1. A atividade anticoagulante	6
1.3.1.1. A coagulação sanguínea	6
1.3.1.2. O uso da heparina como anticoagulante	7
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>9</b>
2.1. Coleta da alga	9
2.2. Extração de polissacarídeos sulfatados	9
2.2.1. Método I	9
2.2.2. Método II	10
2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica.	10
2.3.1. Monitoramento dos polissacarídeos sulfatados	13
2.4. Determinação do açúcar nas frações	13
2.5. Atividade anticoagulante	13
<b>3. RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>14</b>
3.1. Extração de polissacarídeos sulfatados	14
3.2. Fracionamento em DEAE-celulose	14
3.3. Atividade anticoagulante (aPTT) das frações obtidas na coluna de troca iônica	18



## RESUMO

A alga marinha verde *Caulerpa racemosa* pertence à ordem Caulerpales, apresentando vesículas semelhantes a cachos de uva na região ereta e um talo rizomatoso na região basal. Nesta espécie, verifica-se a presença de polissacarídeos sulfatados (PS), os quais são compostos muito estudados atualmente com possíveis usos nas ciências biomédicas e na biotecnologia. Este trabalho teve como propósito extrair, purificar e avaliar a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos dessa alga. Para a extração, foram utilizados dois métodos, I e II. Em ambos, o tecido seco (2 g) foi hidratado com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5 mM. Em seguida, adicionou-se ao material uma solução de papaína bruta, sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado e separado o resíduo do sobrenadante. No método I, foi adicionado CPC 10% para precipitação dos polissacarídeos, seguida de uma nova precipitação com etanol absoluto. No método II, a precipitação foi apenas com etanol absoluto. Finalmente, os polímeros obtidos a partir dos dois métodos foram secos em estufa a 60°C e fracionados em coluna de troca iônica, eluída com diferentes concentrações de NaCl. A atividade anticoagulante foi determinada, nas frações, através de um coagulômetro e o teor de açúcar foi determinado pelo teste de Dubois. O rendimento total dos polissacarídeos extraídos pelo método II foi superior (315mg/g) ao do método I (260mg/g). No entanto, os picos obtidos no fracionamento dos polissacarídeos provenientes do método II (4ª incubação) foram bem menores do que os oriundos do método I, o que denota a possível extração de polissacarídeos não sulfatados. De uma maneira geral, os polissacarídeos sulfatados de *C. racemosa* apresentaram uma baixa atividade anticoagulante, exceto duas frações obtidas na quarta incubação do método II.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Espécies de <i>Caulerpas</i> . (a) <i>C. prolifera</i> ; (b) <i>C. Floridana</i> ; (c) <i>C. racemosa</i> ; (d) <i>C. mexicana</i> ; (e)Região rastejante e (f)Região ereta.	2
Figura 2. Alga marinha verde <i>Caulerpa racemosa</i> .	2
Figura 3. Estrutura dos proteoglicanos (“agregan”) mostrando a proteína central em azul e as cadeias de condroitim sulfato (CS) e queratan sulfato (KS).	3
Figura 4. A cascata de coagulação sanguínea	6
Figura 5. Fluxograma mostrando os procedimentos realizados no método de extração I.	11
Figura 6. Fluxograma mostrando os procedimentos realizados no método de extração II.	12
Figura 7. Rendimento dos polissacarídeos sulfatados obtidos através dos dois métodos de extração utilizados para a alga marinha verde <i>Caulerpa racemosa</i> .	14
Figura 8. Metacromasia, teor de açúcar e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos na 1ª incubação da alga marinha verde <i>Caulerpa racemosa</i> (Método I).	15
Figura 9. Metacromasia, teor de açúcar e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos na 4ª incubação da alga marinha verde <i>Caulerpa racemosa</i> (Método I).	16
Figura 10. Metacromasia, teor de açúcar e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos na 1ª incubação da alga marinha verde <i>Caulerpa racemosa</i> (Método II).	16



# EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO, PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA VERDE *Caulerpa racemosa* (CHLOROPHYTA, CAULERPALES).

JOSÉ ARIÉVILO GURGEL RODRIGUES

## 1. INTRODUÇÃO

As algas estão organizadas em 12 classes, 13 divisões e diversos grupos menores ainda não totalmente estudados. Estas abrangem formas unicelulares, sem muita diferenciação, coloniais, filamentosas e sifonáceas, bem como, complexos talos parenquimatosos, com tecidos especializados para o desenvolvimento de diversas funções (ROUND, 1965; BICUDO, BICUDO, 1970).

Os exemplares da ordem Caulerpales, também citada como Siphonales ou Codiales, são essencialmente marinhas e de águas tropicais apresentando organização filamentosa cenocítica, assumindo um formato de uma célula gigante devido a presença de numerosos filamentos de material da parede celular denominado de trabécula, e constituídos geralmente, de um talo de formato macroscópico fixado ao substrato através de ramos rizoidais simples ou em tufos. O talo apresenta também uma porção rizomatosa resistente, de onde partem ramos eretos com formatos de folhas, penas, cachos de uva ou simplesmente ramificados (Figura 1) (JOLY, 1965; GRAHAM, WILCOX, 2000).

A parede celular das algas do gênero *Caulerpa* não possui celulose e sim polímeros de xilano e manana ligados através de ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4, respectivamente. Suas células possuem numerosos cloroplastos de formato fusiforme e/ou, em alguns casos, observa-se a presença de amiloplastos (LEE, 1999).



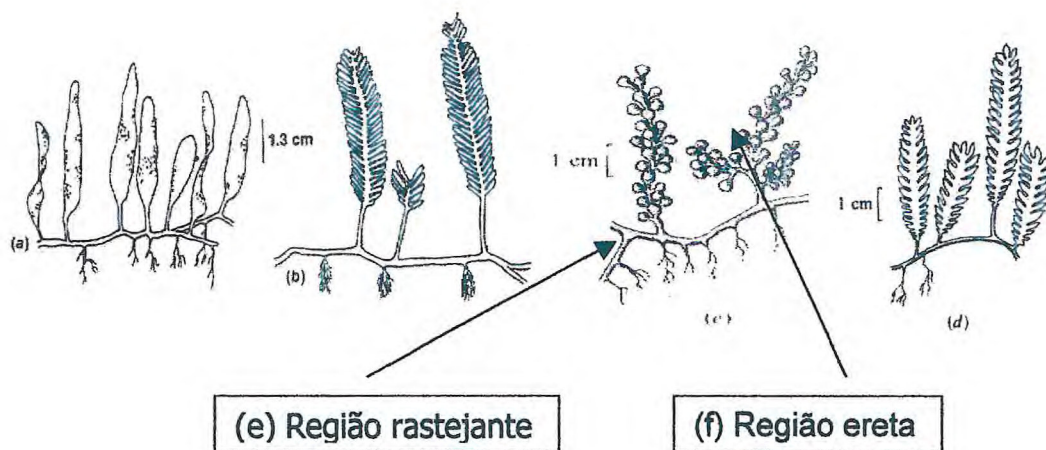


Figura 1. Espécies de *Caulerpa*. (a) *C. prolifera*; (b) *C. Floridaana*; (c) *C. racemosa*; (d) *C. mexicana*; (e) Região rastejante e (f) Região ereta

### 1.1. A alga marinha verde *Caulerpa racemosa*

A família Caulerpáceae, na qual a alga marinha verde *Caulerpa racemosa* se encontra inserida, abrange aproximadamente sessenta espécies reunidas em apenas um gênero (GRAHAM, WILCOX, 2000). Seus exemplares podem atingir mais que um metro de comprimento (SZE, 1998). Esta espécie (Figuras 2) é constituída de uma porção estolonífera fixada ao substrato através de estruturas rizoidais e por ramos eretos de onde partem numerosos ramos curtos. Estes últimos, apresentam formato clavar ou cilíndrico com terminação mais ou menos esférica. Na região basal, destacam-se estolões grossos aderidos ao substrato por ramos finos (JOLY, 1965).



Figura 2. Alga marinha verde *Caulerpa racemosa*.

Fonte: <http://www.aqualandia.hpg.ig.com.br/racemosa.htm>

## 1.2. Os polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados são polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares e carregados negativamente devido à presença de radicais sulfato. Estas moléculas são encontradas nos tecidos dos vertebrados, invertebrados, em grandes quantidades nas algas marinhas e ausentes em plantas superiores (MATHEWS, 1975; CÁSSARO, DIETRICH, 1977; PAINTER, 1983; HUSSEIN et al., 1998).

Geralmente, os polissacarídeos sulfatados formam compostos de maior complexidade ligados covalentemente a uma proteína central sendo denominados de proteoglicanos (PGs) (Figura 3). Nos vertebrados, estes PGs possuem cadeias de polissacarídeos sulfatados denominados de glicosaminoglicanos (GAGs). Dentre os GAGs mais conhecidos estão os galactosaminoglicanos, com destaque para o condroitim sulfato (CS) e o dermatam sulfato (DS), e os glucosaminoglicanos, representados pela heparina e ácido hialurônico (KJELLÉN, LINDAHL, 1991).

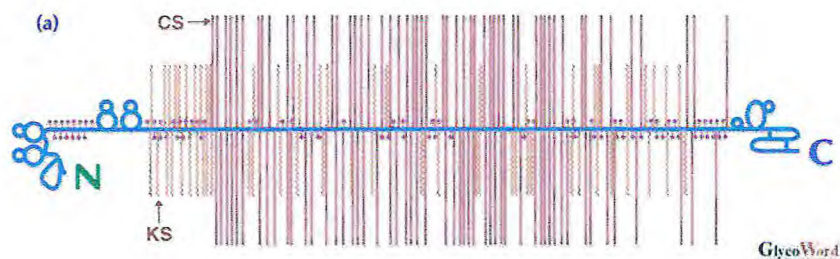


Figura 3. Estrutura de um proteoglicano (“agregan”) mostrando a proteína central em azul e as cadeias de condroitim sulfato(CS) e queratam sulfato (KS).

Segundo PERCIVAL, MCDOWEL (1967), os polissacarídeos sulfatados encontrados nas algas marinhas pardas (Phaeophyceae) podem estar na forma de fucanas, de galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae), destacando-se o ágar e as carragenanas e, nas algas verdes (Chlorophyceae), os mais encontrados são as arabino-galactanas.



Em especial nas algas verdes, diversas pesquisas foram desenvolvidas a fim de se determinar possíveis polissacarídeos presentes nas espécies dessa divisão. RAMANA, RAO (1991), por exemplo, isolaram da alga verde *Cladophora socialis* um heteropolissacarídeo sulfatado, chegando a um polímero formado por unidades de galactose e arabinose unidas através de ligações  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3 e  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, respectivamente.

### 1.3. Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados

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

Nos polissacarídeos sulfatados, uma das atividades biológicas mais amplamente estudadas é a sua ação anticoagulante e antitrombótica, que se expressa em vários representantes como na heparina, no sulfato de dextran, nas fucanas e galactanas sulfatadas (THOMAS et al., 1989; COLLIEC et al., 1991; NISHINO et al., 1991; NISHINO, NAGUMO, 1992). Recentemente, foi isolada e caracterizada a estrutura de uma galactana sulfatada da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* com uma elevada atividade anticoagulante e que também possui atividade antitrombótica (FARIAS et al., 2000; FARIAS et al., 2001).

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

DI ROSA (1972) avaliou os efeitos das carragenanas na indução da inflamação aguda, na úlcera péptica, na coagulação, em granuloma e interferência do sistema imune. Seus estudos baseavam-se em testes do efeito antiinflamatório de novos compostos avaliando a capacidade de suprir o edema de pata de rato causado por esse polímero.



Pesquisas com polissacarídeos sulfatados extraídos de algas pardas, as fucanas sulfatadas, mostraram um grande potencial farmacológico e antiinflamatório (BLONDIN et al., 1994). Além disso, os polissacarídeos sulfatados extraídos das algas, *Nothogenia fastigiata* (vermelha) e *Sargassum homeri* (parda), apresentaram uma alta atividade antiviral contra o vírus do herpes simplex tipo I (DAMONTE et al., 1994; HOSHINO et al., 1998).

Uma galactana sulfatada de alto peso molecular extraída da alga marinha vermelha *Gracilaria corticata* exibiu uma atividade antiviral seletiva contra os vírus do herpes simples tipos I e II, sendo esta atividade mediada através da inibição do ancoramento do vírus na célula hospedeira (MAZUMDER et al., 2002).

Segundo ZHOU et al. (2004), a alga marinha vermelha *Chondrus ocellatus* possui galactanas sulfatadas com atividade antitumoral e imunomodulatória. Esses polissacarídeos foram degradados em frações com diferentes pesos moleculares, sendo que todas apresentaram atividade em maior ou menor grau.

As galactanas sulfatadas extraídas das macroalgas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata* também apresentaram atividade antiviral contra o vírus do herpes simples tipos I e II. O mecanismo de ação dessa atividade está relacionado com a inibição da adsorção do vírus na célula-alvo. Além disso, essas galactanas foram eficientes em evitar a infecção viral do herpes tipo II a partir de uso tópico em vagina de roedores (TALARICO et al., 2004).

Recentemente, pesquisas avaliaram a atividade imunoestimulante da alga marinha *Macrocystis pyrifera* após sua adição na ração para a alimentação de camarões. Segundo RIVERA et al. (2002), dietas compostas com 10, 15 e 20% de algas durante 25 dias revelaram que nos tratamentos com 15 e 20% observou-se maior consumo alimentar em relação a 10%, melhorando assim, a taxa de crescimento e a produção de biomassa.

CAMPA-CÓRDOVA et al. (2002) avaliaram as ações do  $\beta$ -glucano e de um polissacarídeo sulfatado extraído de uma microalga cianofícea, em banhos de imersão com juvenis do camarão branco americano, *Litopenaeus vannamei*, por 1, 3 e 6 horas. Os pesquisadores concluíram que, após 6 horas de imersão,



estes polímeros apresentaram atividade imunoestimulante, sendo que o sulfatado foi 500 vezes mais potente do que o  $\beta$ -glucano (não sulfatado).

Os polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha verde *Ulva pertusa* foram utilizados em testes de atividade anti-hiperlipidêmica. Após a degradação, as frações de baixo peso molecular (U1 e U2) foram fornecidas na dieta de ratos durante 21 dias. Os resultados indicaram que estes polímeros, com diferentes pesos moleculares, exibiram diversos efeitos, diminuindo os níveis de lipídios desses animais (YU et al., 2003).

### 1.3.1. A atividade anticoagulante

#### 1.3.1.1. A coagulação sanguínea

A cascata de coagulação sanguínea (Figura 4) envolve uma série de reações que são dependentes da presença de cálcio podendo ocorrer em duas vias, a intrínseca, que é responsável pelo crescimento e manutenção da rede de fibrina, e a extrínseca, a qual depende de um fator tecidual (DAVIE et al., 1991). Este processo consiste na transformação do sangue líquido em coágulo pela conversão do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina estimulada por uma catálise enzimática. A enzima trombina é necessária para a coagulação do sangue, colaborando tanto para a formação da rede de fibrina como para ativar outros cofatores importantes (OLSON, BJORK, 1992).

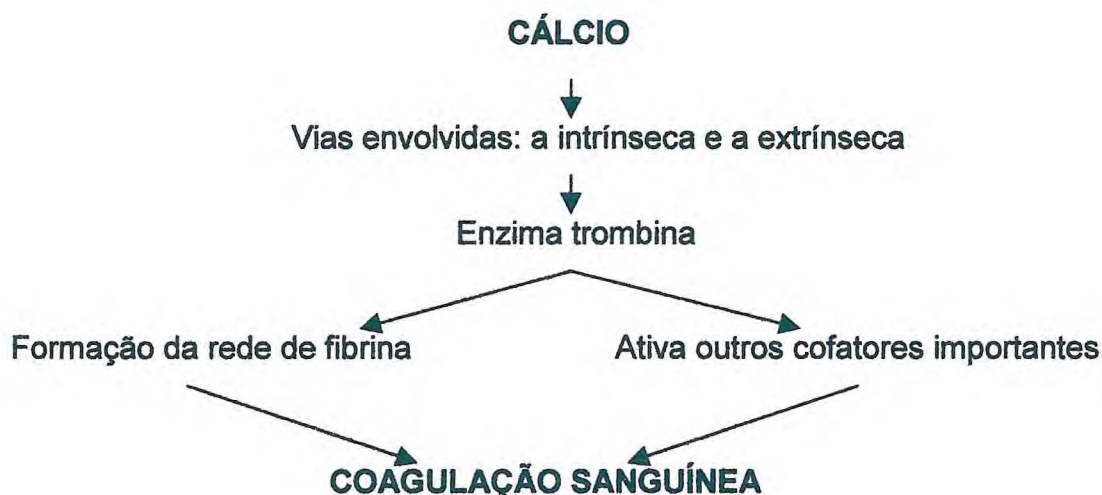


Figura 4 A cascata de coagulação sanguínea



Os componentes, chamados de “fatores”, estão presentes no sangue na forma de precursores inativos que são ativados por proteólise promovendo a ativação de uma pequena quantidade de um certo fator que catalisa a formação de quantidades maiores do fator seguinte e assim sucessivamente, de modo que a cascata proporciona um mecanismo de amplificação (RANG et al., 2001).

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

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

Nas algas marinhas, a atividade anticoagulante encontra-se presente, por exemplo, nas carragenanas extraídas da alga vermelha *Chondrus crispus*, nas fucanas sulfatadas presentes na alga parda *Laminaria digitata* e nas algas verdes, a espécie *Codium fragile* possui um proteoglicano sulfatado denominado de arabino-galactose que apresentou atividade anticoagulante através do prolongamento do tempo da trombina (HAWKINS, LEONARD, 1962; GRAUFFEL et al., 1989; ROGERS et al., 1990).

FARIAS et al. (2000), avaliando o efeito de galactanas sulfatadas extraídas da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, constataram que esta apresenta uma potente atividade anticoagulante inibindo a ação da trombina.

### **1.3.1.2. O uso da heparina como anticoagulante**

A heparina, um polímero da família dos glicosaminoglicanos sulfatados, foi descoberto em 1916. Este polissacarídeo apresenta alta atividade anticoagulante e é extraído de pulmão bovino ou de intestino de suínos, sendo



as de baixo peso molecular as mais utilizadas na clínica médica (RANG et al., 2001).

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

O objetivo deste trabalho foi extrair, purificar e avaliar a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta da alga**

A coleta da alga marinha *Caulerpa racemosa* foi realizada na Praia do Pacheco no município de Caucaia - CE, na maré baixa, sendo acondicionada em sacos plásticos e conduzida ao laboratório.

### **2.2. Extração de polissacarídeos sulfatados**

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

#### **2.2.1 Método I**

Inicialmente, 2 g de alga seca e triturada foram hidratados com 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM.

Em seguida, foram adicionados 7 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL), sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado em tela de 60  $\mu$ , centrifugado a 15.000 rpm e, ao sobrenadante, foram adicionados 6,4 mL de cloreto de cetilpiridínio (CPC) a 10% para a precipitação dos polissacarídeos presentes na mistura por, no mínimo, 24 horas à temperatura ambiente.

Logo após a precipitação, os polissacarídeos sulfatados foram lavados com 200 mL de CPC 0,05% sendo, em seguida, dissolvidos em 70 mL de cloreto de sódio 2 M:etanol absoluto (100:15;v/v) em banho-maria (60°C) e submetidos a uma nova precipitação por, no mínimo, 24 horas a 4°C através da adição de mais 122 mL de etanol absoluto.

Em seguida, o material foi centrifugado e submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol a 80% e uma com 120 mL de etanol absoluto. Após esta etapa, os polissacarídeos sulfatados foram então levados à estufa a 60°C, por um período aproximado de 24 horas para secagem e obtenção do extrato bruto total.



Um esquema mostrando todos os passos da extração por este método está apresentado na Figura 5.

A fim de otimizar o rendimento dos resíduos das extrações foram submetidos a novas incubações.

### **2.2.2. Método II**

A segunda metodologia utilizada é bastante semelhante ao primeiro método. Inicialmente, 2 g da alga seca e triturada foram hidratados com 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM.

Em seguida, foram adicionados 7 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL), sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Ao retirar do banho-maria, o material foi submetido a uma filtração e, ao filtrado, foram acrescentados quatro volumes de etanol absoluto gelado permanecendo em repouso no freezer por 72 horas para precipitação.

Após a precipitação, os polissacarídeos sulfatados foram lavados duas vezes com 200 mL de etanol a 80% e uma vez com 120 mL de etanol absoluto. Finalmente, o material foi levado para secagem em estufa a 60°C para a obtenção do extrato bruto total (Figura 6).

A fim de otimizar o rendimento dos resíduos das extrações foram submetidos a novas incubações.

### **2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica**

Os polissacarídeos brutos obtidos nas 1ª e 4ª incubações de ambos os métodos foram fracionados em coluna de DEAE-celulose acoplada a um coletor de frações, a fim de se comparar o perfil cromatográfico das frações.

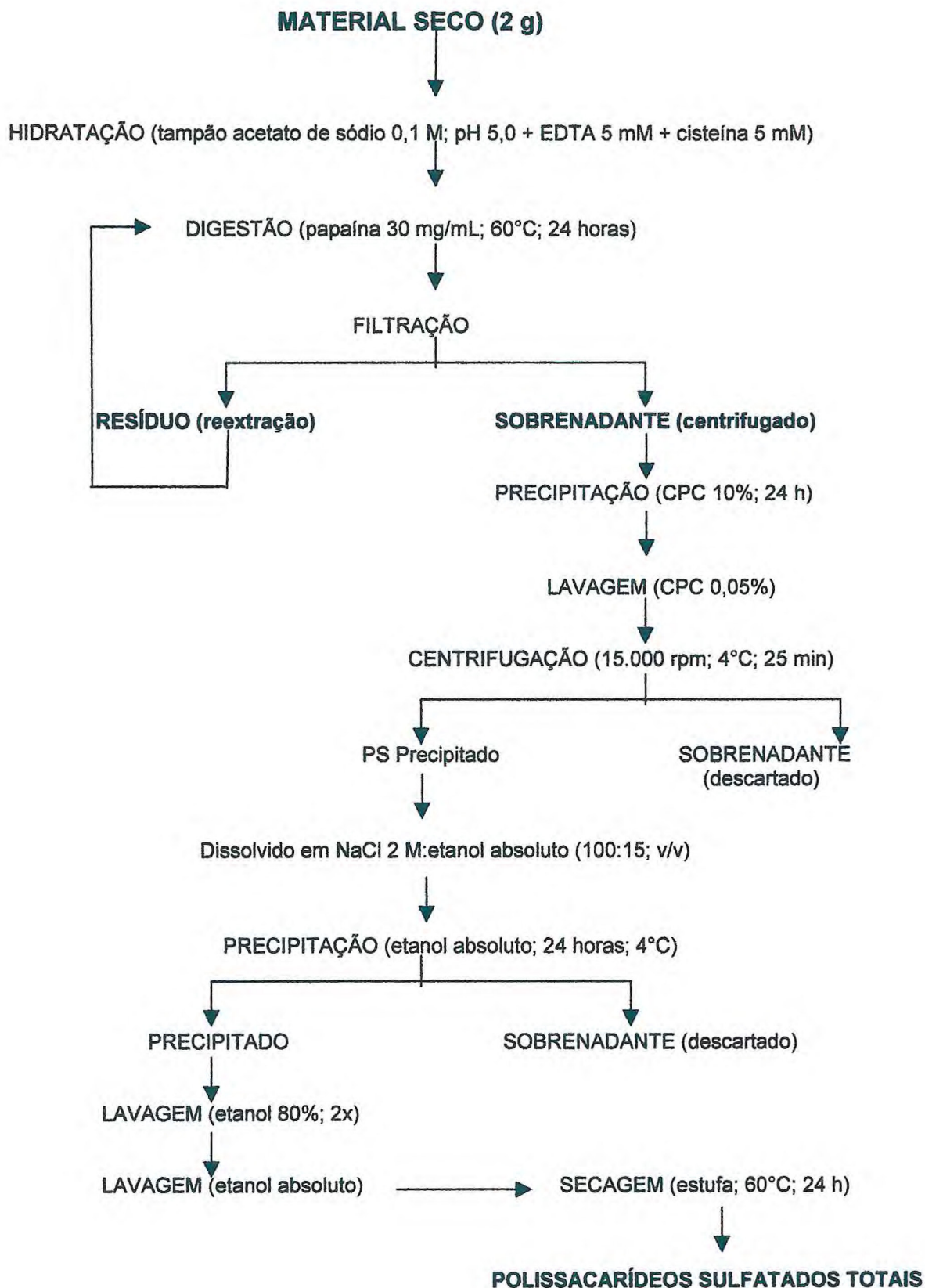


Figura 5. Fluxograma mostrando os procedimentos realizados no método de extração I.

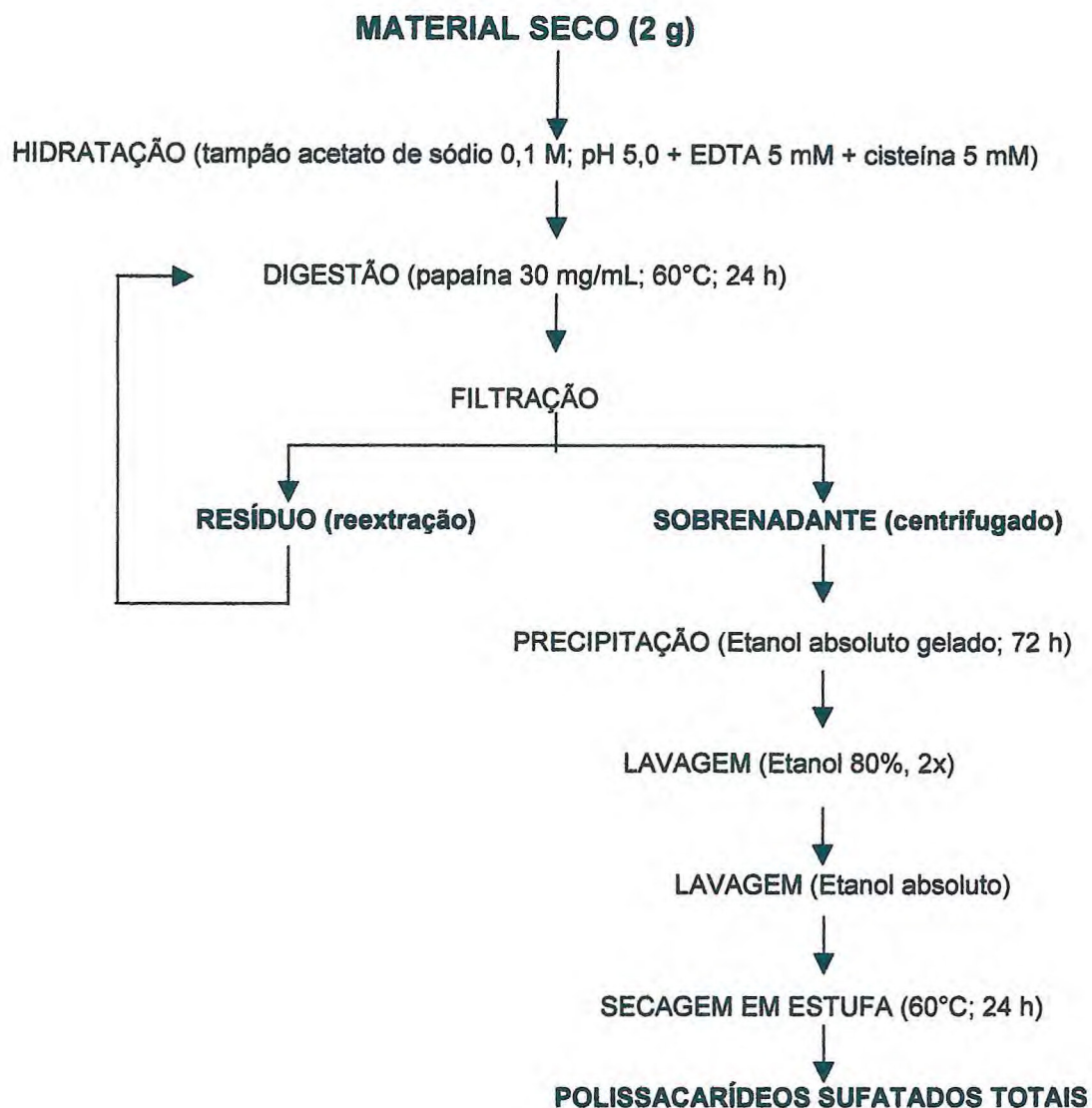


Figura 6. Fluxograma mostrando os procedimentos realizados no método de extração II.

O fluxo da coluna foi de 1 mL/minuto, sendo coletadas frações de 1 mL. A coluna, com 1,5 cm de diâmetro e 6,5 cm de altura foi, inicialmente, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM e eluída, passo a passo, com soluções de diferentes concentrações de NaCl (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,8 e 2,0 M) preparadas no mesmo tampão de equilíbrio.



### **2.3.1. Monitoramento dos polissacarídeos sulfatados**

Os polissacarídeos sulfatados foram monitorados através da reação metacromática com azul-dimetil-dimetileno (DMB) no espectrofotômetro com leitura no comprimento de onda em 525 nm.

### **2.4. Determinação do açúcar nas frações**

A presença do açúcar nas frações foi realizada de acordo com DUBOIS et al. (1956). O teste foi realizado utilizando uma amostra de 50 µL de solução do polissacarídeo, a qual foi incubada por 30 minutos com 350 µL de água destilada, 20 µL de fenol redestilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após a incubação, a amostra foi levada ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância em 490 nm.

### **2.5. Atividade anticoagulante**

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

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

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



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Extração de polissacarídeos sulfatados

A Figura 7 mostra o número de incubações com seus respectivos rendimentos, em ambos os métodos. Foram realizadas quatro incubações para cada método de extração, separadamente. Os resultados mostraram que os rendimentos obtidos pelo método II foram superiores ao método I da 2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> incubações, sendo inferior apenas na 1<sup>a</sup> extração. Além disso, os rendimentos obtidos nas quatro incubações do método I foram decrescentes.

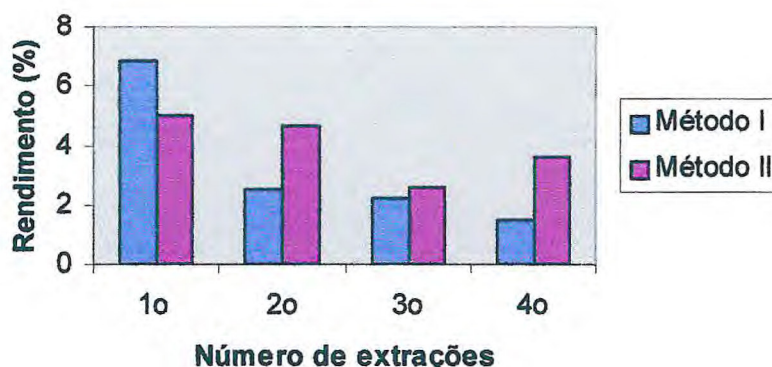


Figura 7. Rendimento dos polissacarídeos sulfatados obtidos através dos dois métodos de extração utilizados para a alga marinha verde *Caulerpa racemosa*.

#### 3.2. Fracionamento em DEAE-celulose

Após o fracionamento dos polissacarídeos brutos obtidos pelo método I, na primeira incubação (Figura 8), verificou-se a presença da atividade metacromática em todas as frações eluídas com NaCl, bem como, a presença de açúcar. A fração eluída com 0,7 M de NaCl apresentou a maior atividade metacromática, seguida das frações eluídas com 1,2 e 0,9 M, respectivamente. Por outro lado, o teor de açúcar não seguiu este padrão nas referidas eluições, sendo elevado nas frações eluídas com 1,8 e 2,0 M de NaCl. Estas mesmas frações apresentaram uma baixa metacromasia.

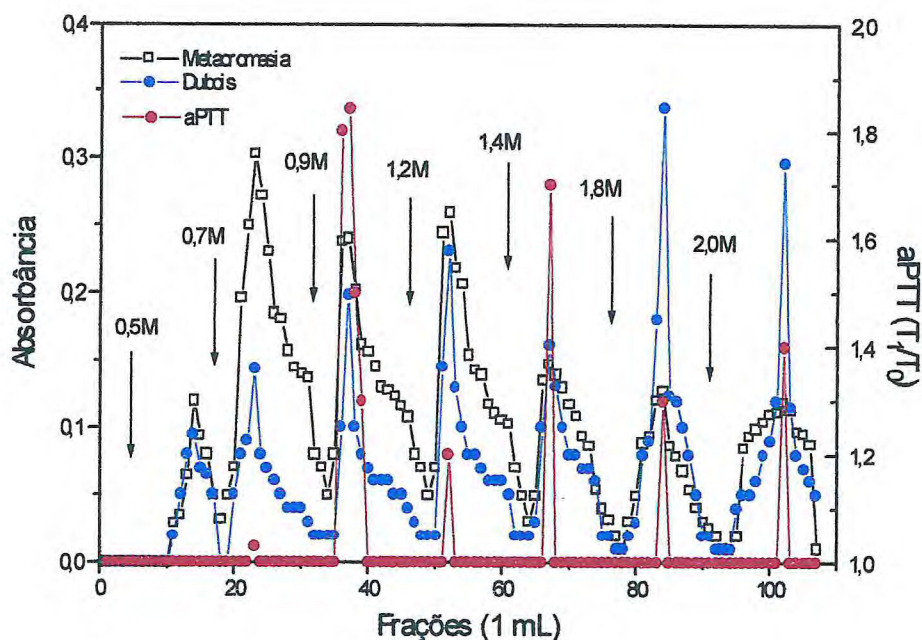


Figura 8. Metacromasia, teor de açúcar e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos na 1<sup>a</sup> incubação da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Método I).

Na quarta incubação (Figura 9), observou-se uma semelhança entre as atividades metacromáticas após as eluições na coluna com as diferentes concentrações de NaCl, sendo também a fração 0,7 M a que apresentou maior atividade. Por outro lado, nenhuma fração foi eluída com 0,5 M de NaCl. Entretanto, na detecção do açúcar, os maiores valores foram observados nas frações eluídas com 2,0; 0,7 e 1,4 M de NaCl, respectivamente.

Pelo método II, na primeira (Figura 10) e quarta (Figura 11) incubações, os resultados diferiram bastante quando comparados ao método de extração I. Na primeira, nenhuma fração foi eluída com 0,5 e 1,8 M de sal. A maior atividade metacromática ficou por conta da fração eluída com 0,7 M de NaCl, semelhante ao ocorrido nas 1<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> incubações pelo método I.

Com relação ao teor de açúcar na 1<sup>a</sup> incubação, os maiores valores foram obtidos nas frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de sal. De uma maneira geral, os picos observados foram inferiores quando comparados aos obtidos com a 1<sup>a</sup> incubação pelo método I.



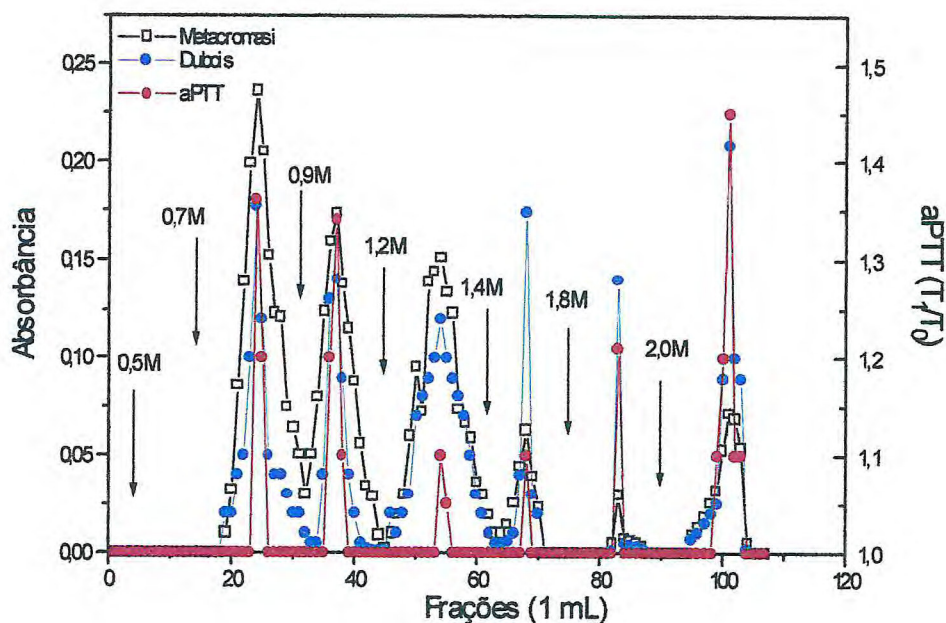


Figura 9. Metacromasia, teor de açúcar e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos na 4<sup>a</sup> incubação da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Método I).

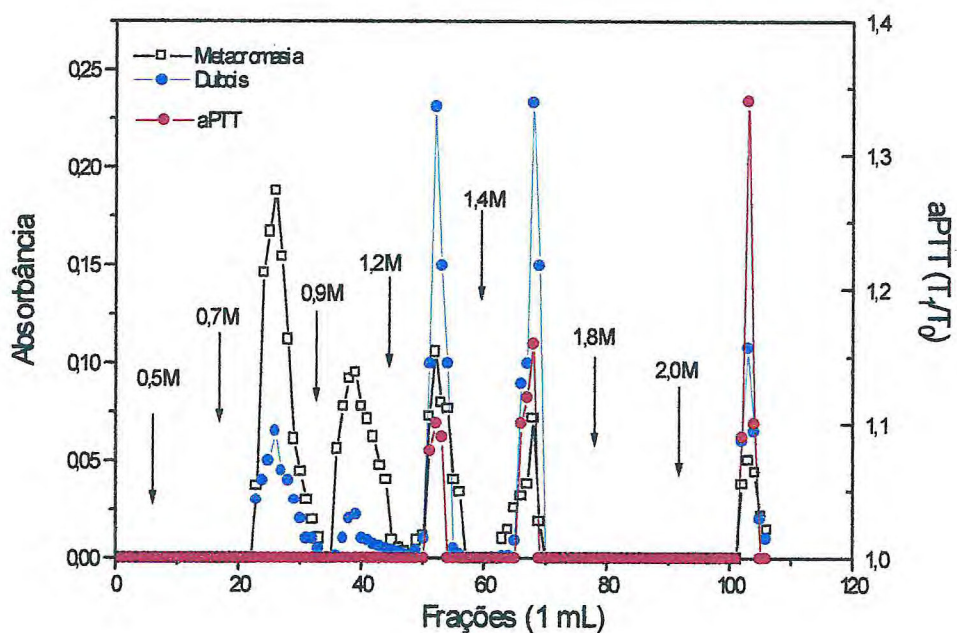


Figura 10. Metacromasia, teor de açúcar e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos na 1<sup>a</sup> incubação da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Método II).

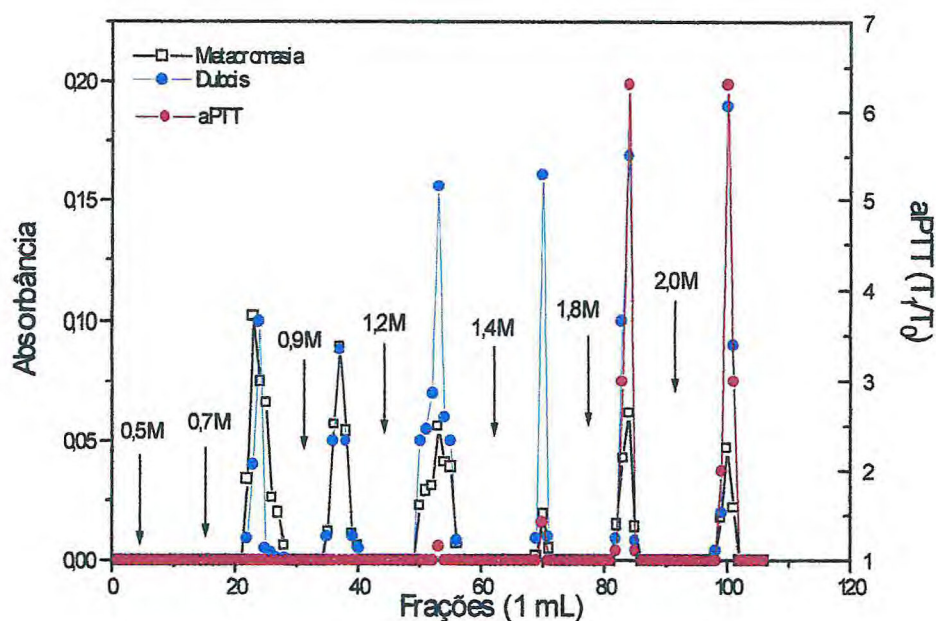


Figura 11. Metacromasia, teor de açúcar e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos na 4<sup>a</sup> incubação da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Método II).

Na quarta incubação do método de extração II, as atividades metacromáticas foram semelhantes às obtidas na 1<sup>a</sup> incubação, no entanto foi eluída uma fração com 1,8 M de NaCl, ausente na 1<sup>a</sup> incubação desse mesmo método.

Na determinação de açúcar, as frações obtidas assumiram um comportamento crescente na medida em que se aumentava a concentração de sal, revelando valores bastante próximos, mas, por outro lado, apresentaram baixas metacromasias.

A avaliação dos dois métodos de extração permite a observação de que os perfis cromatográficos das frações são bastante semelhantes entre a 1<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> incubações do método de extração I e que, estes diferenciam significativamente, quando comparados com as mesmas incubações obtidas pelo método de extração II.



### 3.3. Atividade anticoagulante (aPTT) das frações obtidas na coluna de troca iônica

No método I, na 1ª incubação, a atividade anticoagulante esteve presente em quase todas as frações, exceto na fração eluída com 0,5 M de NaCl. As maiores atividades foram detectadas nas frações eluídas com 0,9 e 1,4 M de sal, prolongando em aproximadamente 1,8 e 1,7 vezes, respectivamente, o tempo normal de coagulação. Na 4ª incubação desse método de extração, estas mesmas frações (0,9 e 1,4 M) tiveram suas atividades reduzidas para aproximadamente 1,35 e 1,1 vezes, respectivamente. Por outro lado, a fração eluída com 0,7 M de sal na 4ª incubação apresentou uma atividade anticoagulante superior (1,35 vezes) à obtida na 1ª incubação (praticamente sem atividade).

No método II, na 1ª incubação, a atividade esteve presente apenas nas eluições com 1,2, 1,4 e 2,0 M de NaCl, sendo esta última a maior, prolongando o tempo de coagulação cerca de 1,3 vezes. Na 4ª incubação do referido método, a atividade anticoagulante foi semelhante nas frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de sal. No entanto, uma elevada atividade foi obtida nas frações eluídas com 1,8 e 2,0 M de sal (mais de 6 vezes que o tempo normal de coagulação) estourando o limite de leitura do aparelho, sendo necessário reduzir para 3  $\mu$ L o volume de solução de polissacarídeo utilizado no teste do aPTT para se detectar o tempo real de coagulação. É importante ressaltar que não se trata de nenhum erro no método já que a atividade se mostrou dose-dependente.

Desta forma, foi possível observar que para a alga marinha verde *Caulerpa racemosa*, o método de extração I, com CPC, foi mais eficiente, pois além de extrair um maior número de frações sulfatadas, também extraiu uma maior quantidade dessas moléculas. Provavelmente, o método II, que utiliza apenas álcool (método II), promoveu também a extração de polissacarídeos neutros, os quais não são capazes de interagir com a coluna de troca iônica.

Com relação à atividade anticoagulante, foi observado que no método II, foram eluídas duas frações com atividade anticoagulante, pelo menos, 5 vezes maior do que as obtidas em qualquer fração extraída pelo método I. Assim, esse método poderá ser utilizado para a produção de polissacarídeos

sulfatados com grande potencial para uso clínico. A baixa atividade anticoagulante não implica em ausência de outras possíveis atividades biológicas. Por exemplo, a galactana sulfatada encontrada na alga marinha *Cryptonemia crenulata* não apresentou atividade anticoagulante (FARIAS, 2000), mas, por outro lado, se revelou um potente agente antiviral (TALARICO et al., 2004).



#### 4. CONCLUSÕES

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

- 1) O rendimento total, considerando todas as incubações, dos polissacarídeos extraídos pelo método II foi maior (315mg/g) do que o obtido pelo método I (260mg/g);
- 2) A coluna de troca iônica DEAE-celulose foi bastante eficiente para separar as diferentes frações de polissacarídeos sulfatados presentes na alga marinha verde *Caulerpa racemosa*;
- 3) Apesar do maior rendimento obtido pelo método II após o fracionamento em DEAE-celulose, foram obtidas frações menores quando comparadas ao primeiro método o que denota a possível extração de polissacarídeos não sulfatados;
- 4) Com relação à atividade anticoagulante, de uma maneira geral, os polissacarídeos sulfatados de *C. racemosa* apresentaram uma baixa atividade, com exceção das duas últimas frações obtidas no fracionamento da quarta incubação pelo método II.
- 5) Em resumo, conclui-se que no método I seria o mais eficiente em extrair os polissacarídeos sulfatados enquanto o método II seria o mais eficiente em extrair polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante presentes na alga marinha verde *Caulerpa racemosa*.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Aquarilândia – Aquarismo marinho. 2000-2001. Disponível em: <<http://www.aqualandia.hpg.ig.com.br/racemosa.htm>>. Acesso em: 28/06/2004.

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

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

BICUDO, C.E.M.; BICUDO, R.M.T. Algas de águas continentais brasileiras. 228p, 1970.

BLONDIN, C.; FISCHER, E.; BOISSON-VIDAL, C.; KAZATCHKINE, M.D.; JOZEFONVICZ, J. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (Fucans) from brown seaweed. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 247-253, Mar 1994.

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.

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

BURSON, 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.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, N.Y.; 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 sulphated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 12, n. 4, 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.

COLLIEC, S.; FISCHER, A.M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C.; DURAND, 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.; WITVROUW, M.; REYEMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.; COTO, C.E.; DECLERCQ, 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.

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

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 24, n. 2, p. 89-102, 1972.

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. Estrutura e atividades anticoagulante e antitrombótica de galactanas sulfatadas da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*. Tese de Doutorado. 102p, 2000.

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

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

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. Algae. Prentice Hall, New York. 736p, 2000.

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.



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

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

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

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.

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

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

LEE, R.E. Phycology. Third edition. 614p, 1999.

MATHEWS, M.B. Polyanionic proteoglycans. IN: Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution. KLEINZELLER; SPRINGER, G.F.; WITMANN, H.G. eds. 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.

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 account for its high antithrombotic action. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, n. 39, p 23973-23984, Sep 1996.

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

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



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

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

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

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

RAMANA, K.S.; RAO, E.V. Studies on Indian seaweeds polysaccharides. 4. Structural features of the sulfated polysaccharide from a green seaweed, *Cladophora socialis*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 30, n. 1, p. 259-262, 1991.

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

RIVERA, G.; YOONG, F.; RIOFRIO, G.B.; REINOSO, B.; HURTADO, F.; MASSUH, P. Inclusion de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera* em alimentos balanceados para camarón. I Congresso Iberoamericano Virtual de Aqüicultura, p. 244-252, 2002. Disponível em: <http://www.civa2003.org> Acesso em:

ROGERS, D.J.; JURD, K.M.; BLUNDEN, G.; PAOLETTI, S.; ZANETTI, F. Anticoagulant activity of a proteoglycan in extracts of *Codium fragile* ssp. Atlanticum. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 2, n. 4, p. 357-361, Dec 1990.

ROUND, F.E. Biologia das algas. 263p, 1965.

SZE, P. A biology of the algae. Third edition. 278p, 1998.

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 an animal model. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 204-209, Apr 1989.

YU, P.Z.; LI, N.; LIU, X.G.; ZHOU, G.F.; ZHANG, Q.B.; LI, P.C. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmacological Research**, London, v. 48, n. 6, p. 543-549, Dec 2003.

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