

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE
ANÁLISE DE METODOLOGIAS DE PRECIPITAÇÃO

SULFATED POLYSACCHARIDES OF THE ALGA *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: ANALYSIS OF
METHODS OF PRECIPITATION

José Tarcísio Borges Bezerra NETO^{1*}; José Ariévilo Gurgel RODRIGUES¹; Grazielle da Costa PONTES¹;
Wladimir Ronald Lobo FARIAS¹

¹Depto de Engenharia de Pesca, Laboratório de Bioquímica Marinha, Universidade Federal do Ceará

*Email: tarcisio_bb@hotmail.com

Recebido em: 16 de outubro de 2007

Resumo - Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas encontradas em muitos organismos na natureza e suas propriedades biológicas têm despertado grande interesse nas ciências médicas. No entanto, o emprego de diferentes métodos de extração influencia o rendimento final de PS. Avaliou-se a eficiência de dois métodos de precipitação (M I e M II) de PS da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides*, comparando-se a extração, o fracionamento e a atividade anticoagulante. Inicialmente, os PS totais foram extraídos através de digestão enzimática, sendo realizadas três extrações. Em seguida, os PS foram precipitados com uma solução de cloreto de cetilpiridínio a 10% (M I) e álcool absoluto (M II). Os extratos foram aplicados em uma coluna de troca iônica DEAE-celulose da qual foram obtidas frações em diferentes concentrações de NaCl. A atividade anticoagulante foi avaliada através do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) utilizando plasma humano normal, sendo o tempo de coagulação determinado em um coagulômetro. Os resultados mostraram que tanto o rendimento como os perfis cromatográficos foram semelhantes entre os métodos, denotando a eficiência das metodologias na obtenção possivelmente do mesmo grupo de moléculas. A espécie apresentou um baixo potencial anticoagulante, onde a fração eluída com 0,9 M de sal foi a mais ativa (M I e M II), prolongando o tempo de coagulação de 1,9 (1^a extração) para 2,12 vezes na 2^a extração no M I. No entanto, esta atividade reduziu-se significativamente para apenas 1,22 vezes na 3^a extração, possivelmente pelo decréscimo da propriedade metacromática em ambos os métodos. Desta forma, a utilização de apenas etanol seria uma forma mais econômica de obtenção desses compostos para avaliação de outras atividades biológicas em *C. sertularioides*.

Palavras-Chave: Clorofíceas Caulerpaceae, Caulerpales, macromoléculas sulfatadas, atividade biológica.

Abstract - The sulfated polysaccharides (SP) are macromolecules found in many organisms in nature and their biological properties have aroused great interest in medical science. However, the use of different methods of extraction influences the SP final yield. It was evaluated the efficiency of the two methods of precipitation (M I and M II) of SP from marine green alga *Caulerpa sertularioides* comparing the extraction, fractionation and anticoagulant activity. Initially, the PS total were extracted by enzymatic digestion, and made three extractions. Then, the SP were precipitated with a solution of cetylpyridinium chloride to 10% (MI) and absolute alcohol (M II). The extracts were applied to a column of ion exchange DEAE - cellulose from which were obtained fractions in different concentrations of NaCl. The anticoagulant activity was evaluated by Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) using normal human plasma, and the clotting time in a coagulometer. The results showed that both the yield and the chromatographic profiles were similar between the methods, denoting the efficiency of the methods in obtaining the same group of molecules. The species presented a low potential anticoagulant, where the fraction eluted with 0.9 M of salt was the most active (M I and M II), extending the time coagulation of 1.9 (1st extraction) to 2.12 times in the 2nd extraction in M I. However, this activity is significantly reduced to only 1.22 times in the 3rd extraction, possibly by the decline of the metachromatic property in both methods. Thus, the only use of ethanol would be a more economical way of obtaining these compounds for evaluation of other biological activities in *C. sertularioides*.

Keywords: Chlorophyta Caulerpaceae, Caulerpales, sulfated macromolecules, biological activity.

INTRODUÇÃO

A biodiversidade marinha brasileira favorece a descoberta de produtos naturais com propriedades biológicas diversas. Bactérias, fungos, algas, invertebrados e vertebrados marinhos são fontes naturais de novos agentes farmacológicos. O isolamento e a avaliação biológica dos diferentes compostos encontrados nesses organismos têm despertado grande interesse na clínica médica (Teixeira, 2002).

As algas marinhas são fontes naturais de macromoléculas conhecidas como polissacarídeos sulfatados (PS). Esses compostos são ainda encontrados em tecidos animais (vertebrados e invertebrados) (Mathews, 1975; Cássaro & Dietrich, 1977) e vegetais (algas e gramíneas marinhas) (Painter, 1983; Hussein, Helmy & Salem, 1998; Aquino, Landeira-Ferdandez, Valente, Andrade & Mourão, 2005), formando, em sua maioria, agregados complexos denominados proteoglicanos.

PS encontrados nas algas marinhas pardas (Phaeophyceae) podem estar na forma de fucanas, de galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae) e, nas algas verdes (Chlorophyceae), os mais encontrados são as arabino-galactanas (Percival & McDowell, 1967). Nos animais, os proteoglicanos são conhecidos como glicosaminoglicanos sendo representados pelo ácido hialurônico, condroitim sulfato, heparim sulfato, queratim sulfato, dermatim sulfato e heparina (Kjellén & Lindahl, 1991).

O interesse no estudo dessas macromoléculas é justificado devido aos efeitos adversos da heparina. Esse PS é mundialmente utilizado como agente anticoagulante e antitrombótico na prevenção e tratamento de trombose venosa. Entretanto, seu uso é limitado devido aos riscos de sangramento, queda plaquetária e viral (Thomas, 1997) em pacientes com estado de hipercoagulapatia ou sujeitos à trombose causada por diferentes etiologias (Weitz, 1994). Embora se tenha desenvolvido heparina de baixo peso molecular, administrações elevadas da droga ainda induzem a fatores de risco (Doutremepuich, Azougagh Oualane, Doutremepuich & Fareed, 1996).

O estudo com diferentes PS presentes em algas marinhas tem demonstrado que a conformação estrutural varia de espécie para espécie, o que resulta em diferentes atividades anticoagulantes (Dietrich et al., 1995; Haroun-Bouhedja, Mostafa, Siquin & Boisson-Vidal, 2000). PS extraídos das algas marinhas vermelhas *Iridaea laminarioides* (Chargaff, Bancroft & Stanley-Brown, 1936), *Gigartina accicularis*, *Chondrus crispus* (Di Rosa, 1972), *Botryocladia occidentalis* (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000) e *Gelidium crinale* (Pereira, et al., 2005) apresentaram potentes atividades anticoagulantes. Propriedades anticoagulantes também foram descritas para as algas marinhas pardas *Ecklonia cava* e *Sargassum horneri* (Athukorala, Jung, Asanthan & Jeon, 2006; Athukorala, Lee, Kim & Jeon, 2007) e as verdes *Codium cylindricum*, *C. fragile* e

Monostroma latissimum (Matsubara, Matsuura, Basic, Liao, Hori & Miyazawa, 2001; Athukorala, Lee, Kim & Jeon, 2007; Zhang, et al., 2008). No entanto, o emprego de diferentes metodologias de extração (Villanueva, Pagba, & Montano 1997; Marinho-Soriano, 2001), a variação sazonal e a utilização de diferentes espécies (Levring, Hoppe & Schmid, 1969; Bird, 1988) influenciam o rendimento e a atividade biológica (Rodrigues & Farias, 2005).

As algas marinhas verdes é um diversificado grupo de organismos fotossintéticos em padrões morfológicos, estruturais e reprodutivos (Hoek et al., 1995). O gênero *Caulerpa* é constituído por algas marinhas verdes bentônicas dotadas de um talo rastejante formado por uma porção rizomatosa que se expande ao longo do substrato, fixando-se através de estruturas denominadas rizóides (Joly, 1965; Sze, 1997). Muitas espécies do gênero são encontradas no litoral brasileiro (Joly, 1965) e alguns trabalhos relatam propriedades biológicas, tais como antiviral e anticoagulante (Ghosh et al., 2004; Rodrigues & Farias, 2005).

O presente estudo teve como objetivo extrair, fracionar e avaliar a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* utilizando duas metodologias de precipitação, contribuindo assim com a bioprospecção de novas macromoléculas anticoagulantes.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA E TRATAMENTO PRELIMINAR DA ALGA MARINHA *C. sertularioides*

Os exemplares da macroalga marinha verde *C. sertularioides* foram coletados na Praia do Pacheco - Ceará e armazenados em sacos plásticos, sendo conduzidos ao Laboratório de Bioquímica Marinha da Universidade Federal do Ceará do Departamento de Engenharia de Pesca. Em laboratório, o material foi lavado com água destilada para a total retirada do sal, areia e organismos incrustantes e/ou epífitas. Em seguida, a alga foi seca ao sol e cortada em pequenos pedaços para extração dos PS.

EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

As extrações foram realizadas a partir de duas metodologias, diferindo apenas quanto ao uso do agente precipitante de PS.

MÉTODO I

Os PS totais (M I) foram obtidos de acordo com Farias, Valente, Pereira & Mourão (2000). Inicialmente, 2 gramas da alga seca foram hidratadas com 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 + EDTA 5mM + cisteína 5mM. Em seguida, foram adicionados 6,8 mL de solução de

papaína bruta (30 mg mL^{-1}), sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado ($60 \mu\text{m}$), centrifugado ($7.965 \times g$; 4°C) 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, o precipitado foi lavado com 200 mL de CPC 0,05% sendo, em seguida, dissolvido em 70 mL de cloreto de sódio 2 M:etanol absoluto (100:15; v/v) e submetido a uma nova precipitação por, no mínimo, 24 horas a 4°C , através da adição de mais 122 mL de etanol absoluto. Posteriormente 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, o precipitado foi então levado à estufa a 60°C , por um período aproximado de 24 horas para secagem e obtenção do extrato bruto.

MÉTODO II

Os PS totais (M II) foram obtidos segundo Rodrigues & Farias (2005). Inicialmente, 2 g da alga seca e triturada foram hidratados com 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM. Em seguida, foram adicionados 6,8 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg mL^{-1}), sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após a incubação, o material foi filtrado ($60 \mu\text{m}$), centrifugado e, ao sobrenadante, acrescentados três volumes de etanol absoluto gelado para precipitação dos PS (48 h) em freezer. Em seguida, o material foi centrifugado e submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol 80% e uma vez com 120 mL de etanol absoluto. Finalmente, o extrato foi seco em estufa (60°C ; 24 h) para obtenção dos polissacarídeos totais.

Os resíduos obtidos de ambas as metodologias foram submetidos a novas extrações a fim de otimizar o rendimento.

FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATDOS EM COLUNA DE TROCA-IÔNICA DEAE-CELULOSE

Os extratos totais de PS obtidos de ambos os métodos foram dissolvidos (1 mg mL^{-1}) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5 mM (AcONa) e aplicados em uma coluna de DEAE-celulose de troca iônica ($6,5 \times 1,5 \text{ cm}$) acoplada a um coletor de frações equilibrada com o mesmo tampão (Rodrigues & Farias, 2005). A coluna foi eluída, passo a passo, com soluções de diferentes concentrações de NaCl (0,50; 0,70; 0,90; 1,20; 1,40 e 1,60 M) também preparadas no mesmo tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi de 60 mL h^{-1} , sendo coletadas frações de 1 mL. Os PS foram monitorados através de alíquotas de 200 μL da fração pela reação metacromática com 1 mL de 1,9-azul-dimetilmetileno (ADM), utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 525 nm.

CARBOIDRATO TOTAL (CT) DAS FRAÇÕES

A presença de CT nas frações foi determinada pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith (1956).

ENSAIOS ANTICOAGULANTES

Os testes anticoagulantes foram realizados *in vitro* através do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) segundo Anderson, Barrowcliffe, Holmer, Johnson & Sims (1976) utilizando plasma humano citratado obtido de cinco diferentes doadores. Primeiramente, o sangue foi centrifugado ($73,75 \times g$; 15 min) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, foram incubados a 37°C por 3 minutos, 50 μL de plasma humano, 50 μL de cefalina ativada (Celite Biolab) e 10 μL de solução de PS. 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 (picos das frações), sendo o tempo de coagulação determinado automaticamente pelo coagulômetro (Drake, modelo Quick-timer) e utilizando a heparina (marca Cristália) como padrão.

RESULTADOS

RENDIMENTO

No total, foram realizadas três extrações para cada método (M I e M II) (Figura 1). Os rendimentos foram bem semelhantes entre si e decrescentes no decorrer das extrações de PS, totalizando apenas 7,10 (M I) e 8,10% (M II), respectivamente. No entanto, a maior quantidade de PS foi obtida durante a 1^a extração, sendo maior no M II quando comparado ao M I.

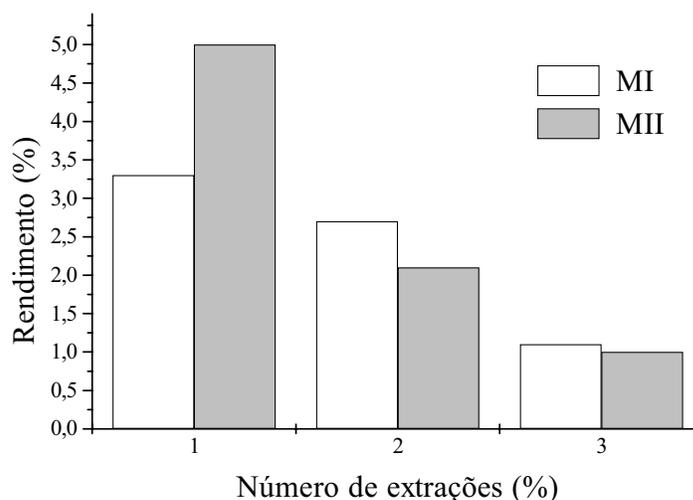


Figura 1 - Rendimentos, por extração, dos extratos brutos obtidos nos M I e M II da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides*.

Trabalhos envolvendo a extração de PS de algas marinhas demonstram que as espécies vermelhas são bastante ricas em PS e que o rendimento também difere segundo a metodologia e a espécie utilizada. Extrações enzimáticas utilizando precipitação com CPC (M I) de PS das algas marinhas vermelhas *Champia feldmanii* (Torres, 2005), *Solieria filiformis* (Pontes, 2005) e espécies do gênero *Halymenia* (Rodrigues & Farias, 2006) apresentaram rendimentos bastante significativos (36,2; 46,8; 47,14 e 53,96%, respectivamente) quando daqueles obtidos da alga marinha verde *C. racemosa* (13%) por Rodrigues & Farias (2005) e da alga marinha parda *Lobophora variegata* (28,4%) (Alencar, 2007). Métodos ácidos são muito empregados para algas pardas (Chotigeat, Tongsupa, Supamataya & Phongdara, 2004) e os aquosos também têm sido amplamente utilizados pelo seu menor custo (Marinho-Soriano, 2001; Ghosh et al., 2004; Zhang et al., 2008). Os rendimentos obtidos pelos M I e M II de *C. sertularioides* foram bem menores que os trabalhos acima supracitados, mas semelhantes comparados a *C. racemosa* (Rodrigues & Farias, 2005), indicando talvez que o gênero seja pouco produtor de PS. O emprego de diferentes metodologias de extração (Villanueva, Pagba & Montano, 1997; Marinho-Soriano, 2001), a variação sazonal e a utilização de diferentes espécies (Levring, Hoppe & Schmid, 1969; Bird, 1988) influenciam no rendimento final.

Neste trabalho, o decréscimo no rendimento (M I e M II) no decorrer das extrações de PS de *C. sertularioides* foi bastante semelhante quando comparado a outras espécies. Rodrigues & Farias (2006) observaram decréscimos no rendimento entre as extrações de PS de duas espécies vermelhas do gênero *Halymenia* utilizando o M I. A alga verde *C. racemosa* também teve o mesmo comportamento quando empregadas às duas metodologias de precipitação utilizadas para *C. sertularioides*. No entanto, a referida espécie diferiu quanto ao número de extratos obtidos. O aumento ou diminuição no rendimento também pode variar de espécie para espécie. Torres (2005) observou que o rendimento aumentou no decorrer do processo de otimização dos PS da alga marinha vermelha *C. feldmanii*, fato também observado por Pereira, Rodrigues & Farias (2006) e Alencar (2007), após estudos com duas espécies da divisão Phaeophyta. O estudo de diferentes métodos de extração de PS é justificado pelas propriedades espessantes e gelificantes desses compostos, as quais lhes agregam considerável valor comercial (Glichsman, 1983).

FRACIONAMENTO DOS PS

Os perfis cromatográficos dos PS foram semelhantes entre os métodos. Na 1ª extração (M I) foi separada cinco frações eluídas com 0,5; 0,7; 0,9; 1,2 e 1,4 M de NaCl, das quais a 0,9 e 1,2 M apresentaram as maiores metacromasias (Figura 2, A). Este comportamento praticamente se

manteve em comparação as 2^a e 3^a extrações (Figuras 2, B e C). O M II também apresentou cromatogramas semelhantes entre si (Figuras 2, D; E e F) e quando comparados ao M I, demonstrando a preponderância de apenas duas frações de PS nos diferentes extratos de *C. sertularioides*. Nas duas metodologias foi observada uma grande presença de carboidratos (Dubois), possivelmente em razão da extração de polissacarídeos neutros.

O comportamento praticamente único nos perfis de PS de *C. sertularioides* foram diferentes daqueles mostrados por Rodrigues & Farias (2005), Rodrigues & Farias (2006) e Alencar (2007). A razão encontrada para as alterações marcantes nos cromatogramas das espécies *Halymenia* sp e *L. variegata* seria a possível extração de PS mais diferenciados, de certa forma comprovada, quando o grau de purificação dessas moléculas aumentou no decorrer do processo de extrações sucessivas. No entanto, como foi possível observar, a extração de PS de *C. sertularioides* resultou em semelhanças entre as extrações, demonstrando a eficiência dos métodos na precipitação do mesmo grupo de moléculas. Assim, tais semelhanças ou diferenças no fracionamento de PS de algas marinhas também seriam determinadas de espécie para espécie.

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

A espécie apresentou frações com atividade anticoagulante em ambos os métodos (Tabela 1). A fração eluída com 0,9 M de sal foi a mais ativa (M I e M II), prolongando o tempo de coagulação do plasma de 1,9 (1^a extração) para 2,12 vezes na 2^a extração no M I. No entanto, esta atividade reduziu-se significativamente para apenas 1,22 vezes na 3^a extração, possivelmente pelo decréscimo da metacromasia. No M II, a atividade anticoagulante da referida fração também sofreu um decréscimo, muito semelhante ao M I, quando também a redução da metacromasia resultou na diminuição da atividade no decorrer das extrações. No entanto, as atividades das frações obtidas nos M I e M II foram inferiores a heparina.

Esses resultados sugerem que é possível extrair frações com atividade anticoagulante diferenciadas, utilizando diferentes extrações do mesmo material. Tal fato também foi comprovado por Rodrigues & Farias (2005), quando duas diferentes frações obtidas na 4^a extração (M II) exibiram significativas atividades anticoagulantes, prolongando em aproximadamente 6,5 vezes o tempo normal do plasma. Torres (2005) relatou que extrações sucessivas de PS utilizando os M I e M II obteve diferentes valores nos tempos de TTPA da espécie vermelha *C. feldimanii*. As maiores atividades anticoagulantes foram observadas em duas frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de NaCl na 4^a extração pelo método M I (CPC), prolongando os tempos de coagulação em cerca de 6,4 e 4,8 vezes, respectivamente. Esses fatos são importantes, já que todos os trabalhos que envolvem

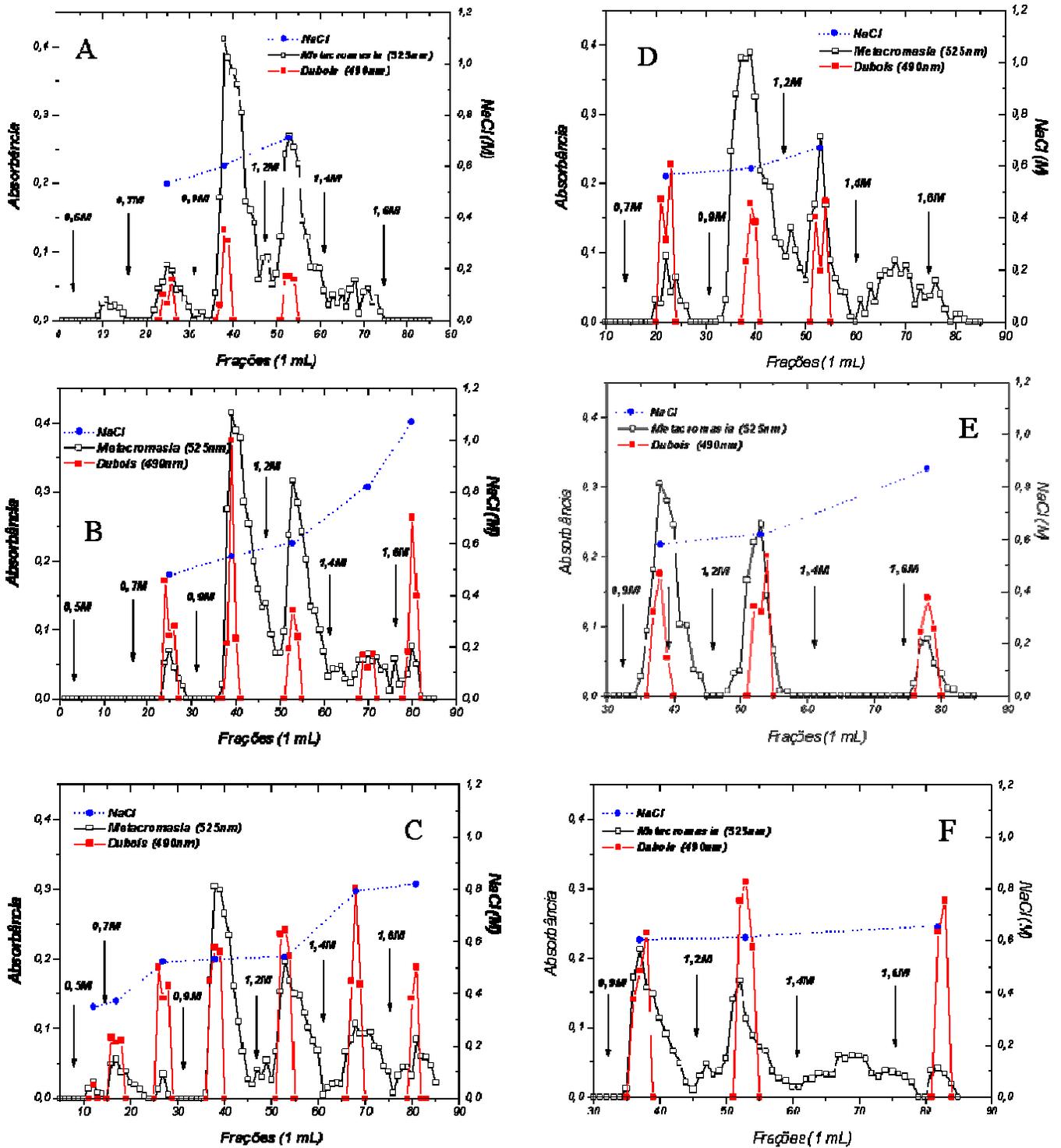


Figura 2 - Cromatografia em DEAE-celulose, por extração, dos polissacarídeos sulfatados obtidos pelos métodos I (A, B e C) e II (D, E e F) da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides*.

extração de PS ou utilizam apenas uma extração ou reúnem os produtos obtidos de mais de uma extração para um único material. O uso da técnica de extrações sucessivas pode resultar na obtenção de PS diferenciados que expressem diferentes valores de atividade na busca de novos fármacos (Rodrigues & Farias, 2006).

Tabela 1 - Atividade anticoagulante (TTPA) dos picos das frações obtidas no fracionamento dos PS (M I e M II) da alga marinha *Caulerpa sertularioides* em relação à heparina.

Frações	1 ^a Extração				2 ^a Extração				3 ^a Extração			
	** TTPA		** TTPA		** TTPA		** TTPA		** TTPA		** TTPA	
NaCl (---)	M I	$T_1 T_0^{-1}$	M II	$T_1 T_0^{-1}$	M I	$T_1 T_0^{-1}$	M II	$T_1 T_0^{-1}$	M I	$T_1 T_0^{-1}$	M II	$T_1 T_0^{-1}$
0,7 M	39,5	1,03	43,7	1,14	38,9	1,01	*	*	41,9	1,09	*	*
0,9 M	73,1	1,90	70,0	1,82	81,3	2,12	55,2	1,44	47,2	1,23	48,7	1,27
1,2 M	45,3	1,18	48,8	1,27	51,6	1,34	48,4	1,26	46,8	1,22	43,3	1,13
1,4 M	*	*	*	*	46,2	1,20	*	*	45,8	1,19	*	*
1,6 M	*	*	*	*	46,7	1,21	48,0	1,25	*	*	49,1	1,28
Plasma	38,4 s											
Heparina	1 μ L (> 240 s) / $T_1 T_0^{-1}$ (> 6,25)											

Resultados da média de duas determinações;

* Valores não determinados;

** TTPA em segundos;

Essa diferenciação na atividade poderá ser melhor entendida através da elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação e também através da caracterização estrutural desses polímeros. Farias, Valente, Pereira & Mourão (2000) reportaram acentuada atividade anticoagulante de uma D-galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *B. occidentalis*. A atividade foi mediada pela inibição da trombina via antitrombina e cofator II da heparina. Além disso, esse polissacarídeo também apresentou uma potente atividade antitrombótica em ratos, quando a dose de 0,2 mg kg⁻¹ expressou seu efeito máximo pelo modelo intravenoso (Farias, Nazareth & Mourão, 2001), demonstrando que um mesmo composto pode exibir diferentes atividades biológicas. Recentemente, Zhang et al. (2008) mostraram que PS extraídos da alga marinha verde *M. latissimum* exibiram diferentes efeitos anticoagulantes quando o tamanho molecular foi reduzido, indicando que a atividade também pode ser determinada pelo tamanho do composto na inibição mais efetiva da trombina. A determinação estrutural dessas moléculas é uma estratégia para elucidar o efeito anticoagulante (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000).

Assim, a otimização do rendimento pela utilização de dois métodos de precipitação de PS da alga marinha verde *C. sertularioides* resultou em frações com atividade anticoagulante.

CONCLUSÕES

A alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* apresentou um baixo potencial anticoagulante. No entanto, as metodologias empregadas para precipitação dos polissacarídeos sulfatados resultaram em perfis comparativamente semelhantes. Desta forma, a utilização de apenas etanol seria uma forma mais econômica de obtenção desses compostos para avaliação de outras atividades biológicas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Alencar, D.B. (2007). *Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda Lobophora variegata*. [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- Anderson, L.O., Barrowcliffe, T.W., Holmer, E., Johnson, E.A. & Sims, G.E.C. (1976). Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. *Throm. Resear.* 9(6): 575-583.
- Aquino, R.S., Landeira-Ferdandez, A.M., Valente, A.P., Andrade, L.R. & Mourão, P.A.S. (2005). Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiol.* 15(1): 11-20.
- Athukorala, Y., Lee, K.W., Kim, S.K. & Jeon, Y.J. (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Biores. Technol.* 98(9): 1711-1716.
- Athukorala, Y., Jung, W.K., Vasanthan, T. & Jeon, Y.J. (2006). An anticoagulante polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydr. Polym.* 66(2): 184-191.
- Bird, K.T. (1988). Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: effects of environmental factors. *Bot. Mar.* 31: 33-39.

- Cássaro, C.M.F. & Dietrich, C.P. (1977). Distribution of sulfated mucopolysaccharides in vertebrates, Bethesda. *Jour. Biol. Chem.* 252(7): 2254-2261.
- Chargaff, F., Bancroft, F.W. & Stanley-Brown, M. (1936). Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition on blood clotting by substances high molecular weight. *Jour. Biol. Chem.* 115:155-161.
- Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. & Phongdara, A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquac.* 233(1-4): 23-30.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3): 350-356.
- Doutremepuich, C., Azougagh Oualane, F. Doutremepuich, F. & Fareed, J. (1996). New class of heparin derivates with a potent antithrombotic effect and a very limited hemorrhagic activity. *Throm. Resear.* 83(3): 217-228.
- Dietrich, C. P., Farias, G. G. M., Abreu, L. R. D., Leite, E. L., Silva, L. F. & Nader, H. B. (1995). A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. *Plan. Scien.* 108(2): 143-153.
- Di Rosa, M. Biological properties of carrageenan. (1972). *Jour. Pharm. Pharm.* 24(2): 89-102.
- Farias, W.R.L., Nazareth, R.A. & Mourão, P.A.S. (2001). Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Throm. Haem.* 86(6): 1540-1546.
- Farias, W.R.L., Valente, A.P., Pereira, M, S. & Mourão, P.S. (2000). 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. *The Jour. Biol. Chem.* 275 (38): 29299-29307.
- Ghosh, P., Adhikari, U., Ghosh, P.K., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E.B. & Ray, B. (2004). In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochem.* 65(23): 3151-3157.
- Glicksman, M. (1983). *Food hydrocolloids. Natural plant exudates – seaweed extracts*. Baton Raton: CRC Press.

- Haroun-Bouhedja, F., Mostafa, E., Sinquin, C. & Boisson-Vidal, C. (2000). Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb. Resear.* 100(5): 453-459.
- Hussein, M.M.D., Helmy, W.A. & Salem, H.M. (1998). Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivatives. *Phytochm.* 48(3): 479-484.
- Hoek, C.V.D., Mann, D.G., Jahns, H.M. (1995). *Algae an introduction to phycology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Joly, A.B. (1965). *Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas*. São Paulo.
- Kjellén, M. & Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: Structures and interactions. *Ann. Rev. Biochem.* 60:443-475.
- Levring, T., Hoppe, H.A. & Schmid, O.J (Eds) (1969). *Marine algae. A survey of research and utilization*. Botanical Marine Handbook.
- Marinho-Soriano, E. (2001). Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta), Gracilariaceae). *Jour. Biotech.* 89(1): 81-84.
- Mathews, M.B. (1975). Polyanionic proteoglycans. In: G. F. Kleinzeller, G. F. Springer. & H. G. Witmann (Eds). *Connective tissue: macromolecular structure and evolution* (pp.93-125). Berlin (GER): Ed. Springer-Verlaq.
- Matsubara, K., Matsuura, Y., Basic, A., Liao, M.L., Hori, K. & Miyazawa, K. (2001). Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *Biol. Macrom.* 28(5): 395-399.
- Painter, T.J. (1983). Algal polysaccharides. In: T.J. Painter (Ed). *The polysaccharides* (pp.195). New York (EUA): Ed. Academic Press.
- Percival, E & Macdowell, R.H. (1967). *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press.
- Pereira, M.G., Benevides, N.M.B., Melo, M.R.S., Valente, A.P., Melo, F.R. & Mourão, P.A.S. (2005). Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. *Carbohydr. Resear.* 340 (12): 2015-2023.

- Pereira, A.P., Rodrigues, J.A.G., Farias, W.R.L. (2006). Extração e otimização de rendimento dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Sargassum* sp. In: *Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica do Cefet* (pp. 00-00). CD-Room do ENICIT, 6.
- Pontes, G.C. (2005). *Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Solieria filiformis* (Solieraceae, Rhodophyta) [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE). Universidade Federal do Ceará.
- Rodrigues, J.A.G. & Farias, W.R.L. (2006). Estudo comparativo de polissacarídeos sulfatados em duas espécies de algas marinhas do gênero *Halymenia* – extração, isolamento e purificação. In: *Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação do Cefet* (pp. 00-00). Fortaleza: CD-Room do ENPPG, 11.
- Rodrigues, J.A.G. & Farias, W.R.L. (2005). Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). In: *Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca* (pp. 1693-1701). Fortaleza: CD-Room do CONBEP, 14.
- Sze, P. (1997). *A biology to the algae*. New York: McGraw-Hill.
- Teixeira, V.L. (2002). Produtos naturais marinhos. In: R. C. Pereira & A. Soares-Gomes (Ed.). *Biologia Marinha* (pp.249-279). Rio de Janeiro (RJ): Ed. Interciência.
- Thomas, D.P. (1997). Does low molecular weight heparin cause less bleeding?. *Throm. Haem.* 78(6): 1422-1425.
- Torres, V.M.T. (2005). *Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Champia feldmannii* [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE). Universidade Federal do Ceará.
- Villanueva, R.D., Pagba, C.V. & Montano, N.E. (1997). Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides* Harvey. *Bot. Mar.* 40: 369-372.
- Weitz, J. (1994). New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. *Dru.* 48: 485-497.
- Zhang, H.J., Mao, W.J., Fang, F., Li, H.Y., Sun, H.H., Chen, Y. & Qi, X.H. (2008). Chemical Characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydr. Polym.* 71(3): 428-434. ✱