

**ANÁLISE DE METODOLOGIAS NA PRECIPITAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA VERDE *Caulerpa racemosa* (FORSSKAL) J. AGARDH<sup>1</sup>**

José Ariévilto Gurgel RODRIGUES; José Tarcísio Borges BEZERRA-NETO; Grazielle da Costa PONTES; Wladimir Ronald Lobo FARIAS

Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará - UFCE

\*email: arieviloengpesca@yahoo.com.br

Recebido em: 3 de junho de 2008

**Resumo** - O aumento das doenças cardiovasculares tem levado à descoberta de novas fontes de compostos anticoagulantes, e os polissacarídeos sulfatados (PS) têm despertado grande interesse nas ciências médicas. No entanto, o emprego de diferentes técnicas pode influenciar o rendimento final de PS. Avaliou-se a eficiência de duas metodologias de precipitação (M I e M II) de PS da alga marinha verde *Caulerpa racemosa*, comparando o rendimento, o fracionamento e a atividade anticoagulante. Inicialmente, os PS totais foram extraídos com papaína bruta, em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, sendo realizadas quatro extrações consecutivas. Em seguida, os PS foram precipitados com uma solução de cloreto cetilpiridínio a 10% (M I) e, alternativamente, com álcool absoluto (M II). Os extratos foram analisados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da qual foram separadas frações através de um gradiente de NaCl. A atividade anticoagulante foi avaliada através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) utilizando plasma humano, sendo o tempo de coagulação registrado em um coagulômetro. Os resultados mostraram que tanto o rendimento como os perfis cromatográficos foram diferentes entre os métodos. A espécie apresentou frações com potentes atividades anticoagulantes quando concentradas com etanol absoluto (M II) seguido do fracionamento com 1,8 e 2,0 M de sal em DEAE-celulose, cujos prolongamentos foram, pelo menos, 4,6 vezes superiores aos tempos registrados nas frações do M I, não sendo estas atividades dependentes da propriedade metacromática dos PS. Desta forma, a utilização de apenas etanol seria uma forma mais econômica de obtenção desses compostos para avaliação das propriedades anticoagulantes de *C. racemosa*.

**Palavras-chave:** *Caulerpa racemosa*, clorofíceas, macromoléculas sulfatadas, atividade biológica.

**ANALYSIS OF PRECIPITATION METHODS OF SULFATED POLYSACCHARIDES EXTRACTED FROM THE GREEN MARINE ALGA *Caulerpa racemosa* (FORSSKAL) J. AGARDH**

**Abstract** - The increase of cardiovascular diseases has led to the discovery of new sources of anticoagulant compounds. Because of its anticoagulant properties, sulfated polysaccharides (SP) have attracted great interest in medical sciences. However, the use of different techniques can influence the SP final yield. The effectiveness of two precipitation methods, for SP from the green marine alga *Caulerpa sertularioides* was evaluated comparing the yield, fractionation and anticoagulant activity. Initially, the total PS were extracted with crude papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, with three consecutive extractions. Then, the SP was precipitated by a 10% cetylpyridinium chloride solution (M I) and, alternatively, by absolute alcohol (M II). The extracts were analyzed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column which were separated fractions by a NaCl gradient. The anticoagulant activity was evaluated by the activated partial time thromboplastin time (APTT) using human plasma, and the clotting time recorded in a coagulometer. The results showed that yield as the chromatographic profiles were different between the methods. The species presented SP fractions with strong anticoagulant activities for the precipitation, with absolute ethanol (M II), followed by a fractionation with 1.8 and 2.0 M of salt in DEAE-cellulose, and prolongations of at least 4.6 times higher than the times recorded in fractions resulted of the precipitation method M I. However, these activities were not dependent on metachromatic property of SP. Therefore, the uses of absolute ethanol result in a more economical procedure for obtaining these compounds to evaluate the anticoagulant properties of *C. racemosa*.

**keywords:** *Caulerpa racemosa*, chlorophyceae, sulfated macromolecules, biological activity.

<sup>1</sup> Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq

## INTRODUÇÃO

A costa brasileira é banhada por águas quentes e frias a qual ocupa regiões tropicais e subtropicais do Atlântico Sul Ocidental, abrigando uma diversificada fauna e flora marinha dentre os mais diversos ecossistemas do planeta. Tal biodiversidade se deve a ocorrência de diferenças climáticas e geológicas do País reunindo cerca de 20% de todas as espécies animais e vegetais existentes (ANDRADE, 2006), favorecendo assim a descoberta de produtos naturais diversos (TEIXEIRA, 2002).

As algas marinhas são ricas em moléculas conhecidas como polissacarídeos sulfatados (PS). Esses compostos são encontrados nas algas marinhas pardas (Phaeophyceae) 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 PS são conhecidos como glicosaminoglicanos sendo representados pelo sulfato de condroitina, sulfato de heparam, sulfato de queratam, sulfato de dermatam e heparina (KJELLÉN; LINDAHL, 1991).

O aumento de doenças cardiovasculares, principais causadoras de morte no mundo, e o uso da heparina, droga mundialmente utilizada como agente anticoagulante e antitrombótico na prevenção e tratamento de trombose venosa em pacientes com estado de hipercoagulapatia ou sujeitos à trombose causada por diferentes etiologias (WEIZT, 1994), tem motivado diferentes estudos envolvendo uma grande variedade de organismos marinhos na perspectiva de substitutos para a heparina (MOURÃO; PEREIRA, 1999).

A considerável variação estrutural dos PS obtidos a partir de diferentes espécies de algas marinhas coletadas em diferentes ambientes ou períodos do ano contribui para a grande heterogeneidade e complexidade desses compostos naturalmente encontrados nesses organismos (FARIAS et al., 2000). Tais características, únicas para cada espécie, podem resultar não apenas em diferentes atividades anticoagulantes (DIETRICH et al., 1995; HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000), mas também na obtenção de distintos compostos quando empregadas diferentes metodologias de extração (VILLANUEVA; PAGBA; MONTANO, 1997; MARINHO-SORIANO, 2001). PS extraídos das algas marinhas vermelhas *Gigartina accicularis*, *Chondrus crispus* (DI ROSA, 1972), *Botryocladia occidentalis* (FARIAS et al., 2000), *Gelidium crinale* (PEREIRA et al., 2005) e *Halymenia pseudofloresia* (RODRIGUES; FARIAS, 2008) apresentaram potentes atividades anticoagulantes. Propriedades anticoagulantes também foram descritas para as algas marinhas pardas *Ecklonia cava* e *Sargassum horneri* (ATHUKORALA et al., 2006; ATHUKORALA et al., 2007) e as

verdes *Codium cylindricum*, *C. fragile* e *Monostroma latissimum* (MATSUBARA et al., 2001; ATHUKORALA et al., 2007; ZHANG et al., 2008).

Algas marinhas verdes do gênero *Caulerpa* têm sido relatadas como possuidoras de algumas atividades biológicas, tais como antiviral e anticoagulante (GHOSH et al., 2004; BEZERRA-NETO et al., 2008). O presente estudo teve como objetivo extrair, fracionar e avaliar a atividade anticoagulante dos PS da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* utilizando duas metodologias de precipitação, contribuindo assim com a bioprospecção de novas macromoléculas com efeitos anticoagulantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### COLETA E EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *C. racemosa*

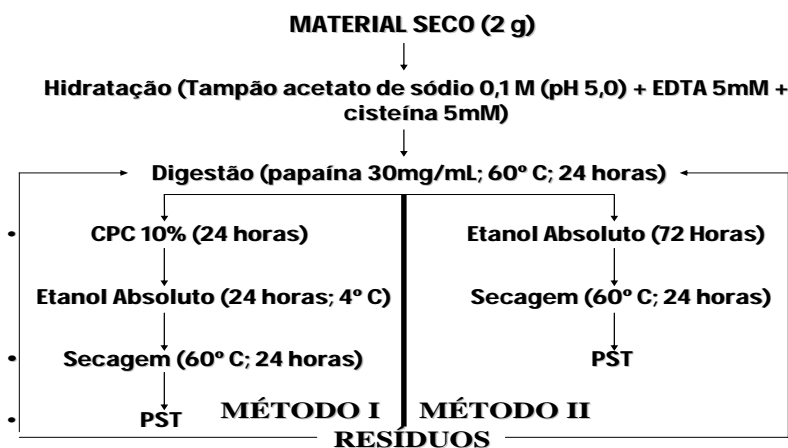
Os exemplares da macroalga marinha verde *C. racemosa* foram coletados na Praia do Pacheco – Ceará e armazenados em sacos plásticos, sendo conduzidos ao Laboratório de Bioquímica Marinha da Universidade Federal do Ceará do Departamento de Engenharia de Pesca. Em laboratório, o material foi lavado com 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.

Metodologias semelhantes de obtenção foram utilizadas, diferindo apenas quanto ao uso do agente precipitante de PS, segundo protocolos combinados de Farias et al. (2000) e Bezerra-Neto et al. (2008). Brevemente, o material seco (2 g) foi digerido com papaína bruta em 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo EDTA 5mM e cisteína 5mM (AcNa) em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado, centrifugado ( $7.965 \times g$ ; 4°C) e, ao sobrenadante, foram adicionados 6,4 mL de cloreto 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, 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 I).

No Método II, logo após a digestão com papaína bruta nas mesmas condições de extração, foram acrescentados três volumes de etanol absoluto para precipitação dos PS (4 °C; 48 h) em freezer. Em seguida, o material foi novamente centrifugado e submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol

80% e a uma terceira, 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 com papaína a fim de otimizar o rendimento, como mostrado na Figura 1.



**Figura 1** - Fluxograma geral de extração dos polissacarídeos sulfatados obtidos através dos métodos I e II de *Caulerpa racemosa*.

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

Uma amostra de cada extrato total de PS obtidos de ambos os métodos foi dissolvida em tampão AcNa até uma concentração final de 1 mg/mL e, em seguida, aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE-celulose (6,5 × 1,5 cm) equilibrada em tampão AcNa e acoplada a um coletor de frações (BEZERRA-NETO et al., 2008). A coluna foi eluída, passo a passo, com soluções de diferentes concentrações de NaCl (0,50; 0,70; 0,90; 1,20; 1,40; 1,60; 1,80 e 2,0 M) também preparadas no próprio tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi de 60 mL/h, sendo coletadas frações de 1 mL/min. Os PS foram monitorados através da propriedade metacromática com 1,9-azul-dimetilmetileno (ADM) utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 525 nm (FARNDAL; BUTTLE; BARRETT, 1986).

#### CARBOIDRATO TOTAL (CT) DAS FRAÇÕES

A presença de CT nas frações foi determinada pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956).

#### ENSAIOS ANTICOAGULANTES

Os testes anticoagulantes (*in vitro*) foram realizados através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) segundo Anderson et al. (1976) utilizando plasma humano citratado obtido de cinco

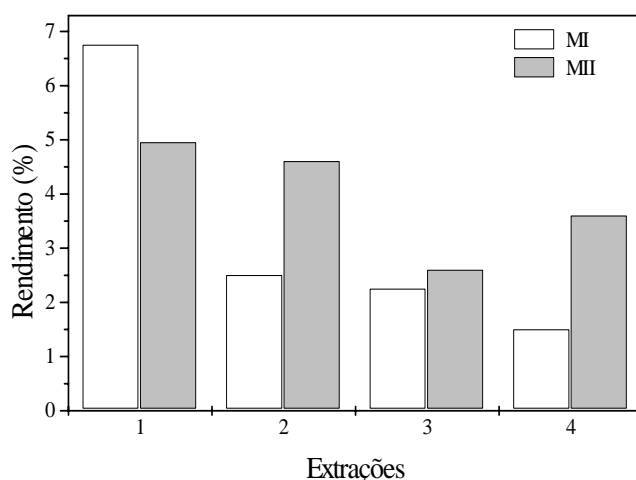
diferentes doadores. Primeiramente, o sangue foi centrifugado ( $73,75 \times g$ ; 15 min) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, foram incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, 50  $\mu\text{L}$  de plasma humano, 50  $\mu\text{L}$  de cefalina ativada (Celite Biolab) e 5  $\mu\text{L}$  da fração de PS. Após a incubação, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de cloreto de cálcio 0,025 M à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os testes foram realizados em duplicata, sendo o tempo de coagulação determinado automaticamente pelo coagulômetro (Drake, modelo Quick-timer).

## RESULTADOS

### RENDIMENTO

O emprego da digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) resultou em quatro extrações consecutivas de PS totais para cada método (M I e M II) (Figura 2). Os rendimentos foram superiores no M II quando comparados ao M I, totalizando 15,75 e 13%, respectivamente. O M II apresentou certa variação (2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> extrações) enquanto o M I decresceu ao longo da otimização do rendimento de *C. racemosa*. Além disso, a maior quantidade de PS totais deste último foi obtida durante a primeira extração.

Trabalhos envolvendo a extração de PS de algas marinhas demonstram que o rendimento pode sofrer variação segundo a metodologia e a espécie utilizada. Extrações enzimáticas consecutivas seguidas de precipitação com CPC (M I) de PS das algas marinhas vermelhas *Champia feldmanii* (TORRES, 2005), *Solieria filiformis* (PONTES, 2005) e *Halymenia pseudofloresia* (RODRIGUES; FARIAS, 2008) apresentaram rendimentos totais bastante elevados (36,2; 46,8 e 63,96%, respectivamente) quando daqueles obtidos da alga marinha verde *C. sertularioides* (7,10%) por BEZERRA-NETO et al. (2008) e da alga marinha parda *Lobophora variegata* (28,4%) segundo Alencar (2007). Amorim (2005) obteve na realização de três extrações aquosas consecutivas seguida por concentração com etanol absoluto em diferentes condições de temperatura (60 e  $80^{\circ}\text{C}$ ) rendimentos de frações solúveis de PS totais da alga marinha vermelha *Halymenia floresia* de 4; 20,6 e 14%, respectivamente. Métodos aquosos são amplamente utilizados pelo seu menor custo (MARINHO-SORIANO, 2001; ZHANG et al., 2008). Os rendimentos obtidos pelos M I e M II de *C. racemosa* foram inferiores aos trabalhos acima, mas semelhantes quando comparados a *C. sertularioides* (BEZERRA-NETO et al., 2008).



**Figura 2** - Rendimentos, por extração, dos extratos brutos obtidos dos M I e M II da alga marinha verde *Caulerpa racemosa*. A alga foi desidratada ao sol e triturada seguida de hidratação em tampão AcNa (pH 5,0) para posterior adição da protease cisteínica papaína na extração dos PS totais.

Neste trabalho, o decréscimo nos rendimentos no decorrer das extrações consecutivas de PS de *C. racemosa* também tem sido observado quando comparado a outras macroalgas marinhas. Torres (2005) observou que, utilizando do M I, o rendimento aumentou no decorrer do processo de otimização dos PS da alga marinha vermelha *C. feldmannii*, fato também observado por Alencar (2007), após estudos com a feofíceia *L. variegata*. Recentemente, Rodrigues e Farias (2008) reportaram decréscimos marcantes entre as extrações de PS da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* quando empregado o M I. A clorofíceia *C. sertularioides* apresentou comportamentos semelhantes quando empregadas às duas metodologias de precipitação (BEZERRA-NETO et al., 2008) utilizadas para *C. racemosa*. No entanto, somente três extratos foram obtidos para a referida espécie. O emprego de diferentes metodologias de extração (VILLANUEVA; PAGBA; MONTANO, 1997; MARINHO-SORIANO, 2001), o uso de diferentes agentes precipitantes (Torres, 2005), a variação sazonal e a utilização de diferentes espécies (LEVRING; HOPPE; SCHMID, 1969; BIRD, 1988) podem influenciar o rendimento final de PS. As propriedades espessantes e gelidificantes desses compostos em muitas espécies de algas marinhas lhes agregam considerável valor comercial em diversas aplicações na indústria (GLICKSMAN, 1983).

#### FRACIONAMENTO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

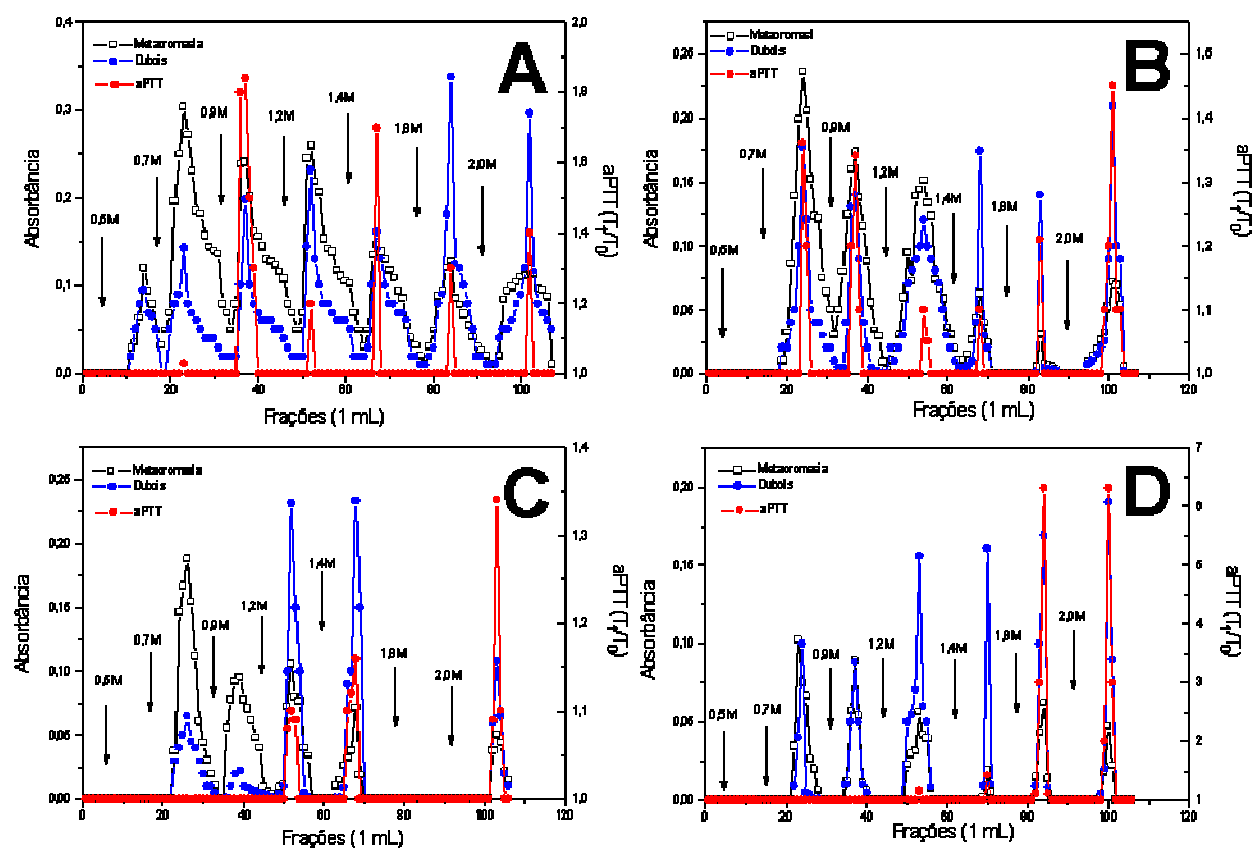
Os perfis cromatográficos obtidos durante o fracionamento dos PS totais em coluna de troca iônica DEAE-celulose foram diferentes entre os métodos. A 1ª extração (M I) mostrou a separação de sete frações eluídas com 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,8 e 2,0 M de NaCl, das quais a 0,7; 0,9 e 1,2 M

apresentaram as maiores metacromasias (Figura 3A). Este comportamento não se manteve em comparação a 4<sup>a</sup> extração, quando diferenças numéricas e na intensidade metacromática das frações foram observadas (Figura 3B). O M II apresentou cromatogramas bem diferentes entre si (Figuras 3C e 3D) e principalmente quando comparados ao M I, demonstrando a redução do número de frações eluídas de PS ao longo da técnica nos diferentes extratos de *C. racemosa*. Também foi observada uma maior presença de polissacarídeos totais quando alíquotas das frações foram dosadas pelo método Dubois, possivelmente em razão da extração de polissacarídeos neutros (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

A extração sequencial dos PS oriundos do mesmo resíduo tecidual de *C. racemosa* resultou em diferenças marcantes entre os perfis cromatográficos (1<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> extrações) obtidos em ambos os métodos. Lima (2007) e Rodrigues e Farias (2008) também relataram diferenças nos perfis cromatográficos entre as extrações consecutivas das algas marinhas *Spatoglossum shroederi* e *H. pseudofloresia*, respectivamente, quando colunas de troca iônica DEAE-celulose foram utilizadas no fracionamento de PS. Tais características sugerem a extração de polissacarídeos mais diferenciados os quais podem estar alocados em diferentes camadas do tecido desses organismos. O emprego da técnica na extração de PS da alga marinha verde *C. sertularioides* resultou na eficiência de ambos os métodos (M I e M II) na precipitação do mesmo grupo de moléculas, com semelhantes observados (BEZERRA-NETO et al., 2008). Desta forma, a avaliação dessas macromoléculas em colunas de separação pode render frações com propriedades e composições químicas diferentes. Além disso, polissacarídeos de cada espécie de alga possuem suas características próprias e dificuldades durante os procedimentos de separação e purificação em razão da complexidade e heterogeneidade dessas macromoléculas (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005).

As alterações dos tempos de coagulação (TTPA) das frações oriundas das diferentes extrações utilizando CPC (M I) e etanol absoluto (M II) como agentes precipitantes de PS reforçam tais características desses compostos. A atividade anticoagulante foi detectada na maioria das frações isoladas em ambos os métodos (Figura 3).

As frações eluídas com 0,9 e 1,4 M de sal foram as mais ativas na 1<sup>a</sup> extração (M I) (Figura 3A) enquanto a fração eluída com 2,0 M (4<sup>a</sup> extração) prolongou, no máximo, o tempo de coagulação em cerca de 1,8 vezes (Figura 3B), não sendo estas atividades dependentes da propriedade metacromática dos PS.



**Figura 3** - Cromatografias em DEAE-celulose (1<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> extrações) dos polissacarídeos sulfatados obtidos pelos métodos I (A e B) e II (C e D) da alga marinha verde *Caulerpa racemosa*. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa. Os PS adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão de AcNa contendo NaCl em diferentes concentrações (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 M). Os PS foram monitorados com azul-dimetilmetileno a 525 nm. (■—■) açúcar total; (○—○) propriedade metacromática; (■—■) Atividade anticoagulante (TPA) expressa pela relação  $T_1 T_0^{-1}$  de prolongamento do tempo de coagulação do plasma humano normal ( $T_0 = 38$  s).

No entanto, a atividade anticoagulante de duas diferentes frações eluídas com 1,8 e 2,0 M (M II) oriundas da 4<sup>a</sup> extração (Figura 3D) dos PS de *C. racemosa* foram observados elevados TTPAs, cujos prolongamentos foram, pelo menos, 4,6 vezes superiores aos tempos registrados nas frações do M I (Figuras 3A e 3B). Geralmente, um elevado prolongamento no TTPA sugere-se que o composto promova inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação (ATHUKORALA et al., 2006; ATHUKORALA et al., 2007; ZHANG, et al., 2008). A ação desses compostos na coagulação não ocorre meramente como uma função de densidade de cargas, mas também dependente da



composição monossacarídica, posição de sulfatação e principalmente na ocorrência de unidades desulfatadas (MOURÃO, 2004).

Os resultados também reforçam que é possível extrair frações com atividade anticoagulante diferenciadas, utilizando diferentes extrações do mesmo material como reportado por Bezerra-Neto et al. (2008) e Rodrigues e Farias (2008). Torres (2005) relatou que em extrações sucessivas de PS utilizando os M I e M II obteve diferentes valores nos TTPAs da rodofícea *Champia feldimannii*. As maiores atividades anticoagulantes foram registradas em duas frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de NaCl oriundas da 4<sup>a</sup> extração utilizando o método M I (CPC), prolongando os tempos de coagulação em cerca de 6,4 e 4,8 vezes, respectivamente.

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 et al. (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, estes últimos os reguladores da coagulação sanguínea. Além disso, esse polissacarídeo também apresentou uma potente atividade antitrombótica em ratos, quando a dose de 0,2 mg kg<sup>-1</sup> expressou seu efeito máximo pelo modelo intravenoso (FARIAS et al., 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 composto é fragmentado em diferentes pesos moleculares na inibição mais efetiva da trombina. Fonseca et al. (2008) reportaram um estudo comparativo entre duas galactanas sulfatadas isoladas das rodofíceas *B. occidentalis* e *Gelidium crinale* envolvendo relações entre suas diferenças nas proporções e/ou distribuição dos radicais sulfato na cadeia com seus mecanismos distintos de interação dessas galactanas entre proteases, inibidores e ativadores do sistema de coagulação para elucidar suas relações nas atividades anti- e procoagulantes, além da ação antitrombótica desses compostos.

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

## CONCLUSÃO

Polissacarídeos sulfatados isolados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* se apresentaram como consideráveis agentes anticoagulantes. Desta forma, o emprego de apenas etanol seria uma forma mais econômica de obtenção desses compostos para avaliação de suas propriedades anticoagulantes.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, D.B. *Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda Lobophora variegata*. 2007. 35f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2007.
- AMORIM, R.C.N. *Polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas Gracilaria ornata Areschoug e Halymenia floresia (Clemente) C. Agardh: caracterização química e atividade biológica*, 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.
- ANDERSON, L.O., et al. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. *Thrombosis Research*, v.7, n.1, p.575-583, 1976.
- ANDRADE, R. *Brasil: conservação marinha: nossos desafios e conquistas*. São Paulo: Empresa das Artes, 2006, não paginado.
- ATHUKORALA, Y., et al. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresearch Technology*, v.98, n.9, p.1711-1716, 2007.
- ATHUKORALA, Y., An anticoagulante polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, v.66, n.2, p.184-191, 2006.
- BEZERRA-NETO, J.T.B., et al. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise de metodologias de precipitação. *Revista Brasileira Engenharia de Pesca*, v.3, n.2, p.50-62, 2008.
- BIRD, K.T. Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: effects of environmental factors. *Botanica Marina*, v.31, p.33-39, 1988.
- DIETRICH, C.P., et al. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. *Plant Science*, v.108, n.2, p.143-153, 1995.
- DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.24, n.2, p.89-102, 1972.
- DUBOIS, M., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemical*, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

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

FARIAS, W.R.L., et al. 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 Journal of Biology Chemistry*, v.275, n.38, p.29299-29307, 2000.

FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochemistry et Biophysica Acta*, v.883, n.2, p.173-177, 1986.

FONSECA, R.J.C. et al. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. *Thrombosis and Haemostasis*, v.99, p.539-545, 2008.

GHOSH, P., et al. *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*, v.65, n.23, p.3151-3157, 2004.

GLICKSMAN, M. *Food hydrocolloids. Natural plant exudates – seaweed extracts*. Baton Raton: CRC Press, 1983.

HAROUN-BOUHEDJA, F., et al. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thrombosis Research*, v.100, n.5, p.453-459, 2000.

KJELLÉN, M.; Lindahl, U. Proteoglycans: Structures and interactions. *Annual Review of Biochemistry*, v.60, p.443-475, 1991.

LEVRING, T.; HOPPE, H.A.; SCHMID, O.J. *Marine algae. A survey of research and utilization*. Botanical Marine Handbook, 1969.

LIMA, P.C.W.C. *Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi* sobre o aumento da resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse*, 2007. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza. 2007.

MATSUBARA, K., et al. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.28, n.5, p.395-399, 2001.

- MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta), Gracilariaceae). *Journal of Biotechnology*, v.89, n.1, p.81-84, 2001.
- MOURÃO, P.A.S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, v.10, n.9, p.967-981, 2004.
- MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S. Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends Cardiovascular Medicine*, v.9, n.8, p.225-232, 1999.
- PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R.H. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press, 1967. 219p.
- PEREIRA, M.G., Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? *Carbohydrate Research*. v. 340, n. 12, p.2015- 23, 2005.
- PONTES, G.C. *Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Solieria filiformis (Solieraceae, Rhodophyta)*, 2005. 35f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.
- RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Purificação e atividade anticoagulante *in vitro* de galactanas sulfatadas extraídas da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 3, n. 2, p. 16-29, 2008.
- TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais marinhos. In: R. C. PEREIRA; A. SOARES-GOMES (Ed.). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro (RJ): Ed. Interciência, 2002. p. 249- 79.
- TORRES, V.M. *Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Champia feldmannii*, 2005. 37f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.
- VILLANUEVA, R.D.; PAGBA, C.V.; MONTANO, N.E. Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides* Harvey, *Botanica Marina*. v. 40, p. 369- 72, 1997.
- WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potentials, *Drugs*. v. 48, p. 485- 97, 1994.
- ZHANG, H.J., et al. Chemical Characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*, *Carbohydrate Polymers*. v.71, n.3, p.428-34, 2008. ❀