

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DE RODOFÍCEAS *Halymenia* spp.: FERRAMENTA TAXONÔMICA PARA ALGAS? ¹

José Ariévilto Gurgel RODRIGUES* ; Wladimir Ronald Lobo FARIAS

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

*e-mail: arieviloengpesca@yahoo.com.br

Recebido em: 21 de abril de 2008

Resumo - Os polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros complexos encontrados em diversos organismos marinhos e que têm despertado grande interesse nas ciências médicas e na biotecnologia de recursos aquáticos. Portanto, neste trabalho objetivou-se extrair e comparar por cromatografia e eletroforese frações de PS de duas espécies de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* com vistas a suas aplicações como possíveis indicadores moleculares taxonômicos. Inicialmente, os PS foram extraídos com papaína bruta em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, a partir de exemplares coletados na Praia do Flecheiras/CE. Em seguida, os extratos foram analisados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose através de um gradiente de NaCl e as frações, concentradas por liofilização, submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5%. Verificaram-se diferenças marcantes entre os extratos durante o fracionamento e no grau de purificação dessas macromoléculas quando reveladas por eletroforese. Os resultados sugerem que estudos comparativos desses compostos, utilizando diferentes espécies, poderiam ser mais uma estratégia importante na identificação bioquímica de táxons e na bioprospecção de novos agentes farmacológicos.

Palavras-chave: polissacarídeos sulfatados, *Halymenia*, marcadores moleculares.

COMPARATIVE EVALUATION OF SULFATED POLYSACCHARIDES EXTRACTED FROM *Halymenia* spp. (RHODOPHYCEAE): A TAXONOMIC TOOL OF ALGAE?

Abstract - Sulfated polysaccharides (SP) are complex polymers found in various marine organisms, which have aroused great interest in the medical sciences and biotechnology of aquatic resources. Thus, it was aimed to extract and compare by electrophoresis and chromatography fractions of SP of two species of marine red algae of the genus *Halymenia* with a view to their possible applications as taxonomic molecular indicators. Initially, the SP were extracted with crude papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, from algae collected at Flecheiras Beach/CE. Then, the extracts were analyzed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column submitted to a NaCl gradient, followed by 0.5% agarose gel electrophoresis, when fractions were concentrated by lyophilization. It was found marked differences among the extracts in fractionation and purification degree of these macromolecules. The results suggest that comparative studies of these compounds, using different species, can be one more important strategy in biochemical identification of algae and bioprospection of new pharmacological agents.

Key words: sulfated polysaccharide, *Halymenia*, molecular markers.

¹ Trabalho realizado com apoio financeiro do MCT/PADCT/CNPq/CAPES.

Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca, UFC.

INTRODUÇÃO

As algas representam um grupo de organismos fotossintetizantes que abrangem formas unicelulares, sem muita diferenciação, coloniais, filamentosas e sifonáceas, bem como complexos talos parenquimatosos, com tecidos especializados para o desenvolvimento de diversas funções biológicas (SZE, 1997). A diversidade de seus processos reprodutivos (vegetativo, sexuada e assexuada) sugere que as algas passaram por mudanças evolutivas ao longo de gerações, e sendo capazes de sintetizar inúmeras classes de compostos os quais estão normalmente envolvidos nos processos metabólicos comuns a todos ser vivo ou particulares de grupos taxonômicos específicos. Nos últimos anos, o interesse no estudo ecológico e evolutivo de metabólitos (polissacarídeos, lipídios, alcalóides, terpenóides etc) encontrados na biodiversidade marinha vem convergindo pesquisas na utilização de macromoléculas como marcadores taxonômicos, filogenéticos e biogeográficos em organismos marinhos (TEIXEIRA, 2002).

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros de açúcares repetitivos dotados de carga negativa devido à presença de radicais sulfato. Esses compostos são 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 et al., 2005), formando, em sua maioria, agregados complexos denominados proteoglicanos.

Percival e Mcdowell (1967) relatam que, nas algas marinhas, os PS podem estar na forma de fucanas (Phaeophyceae), de galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae) e, nas algas verdes (Chlorophyceae), os mais encontrados são as arabino-galactanas. Nos animais, os proteoglicanos estão representados pelo ácido hialurônico (polissacarídeo não-sulfatado), condroitim sulfato, heparim sulfato, queratim sulfato, dermatim sulfato e heparina (KJELLÉN; LINDAHL, 1991).

A necessidade de explorar novas biomoléculas com propriedades biológicas oriundas de algas (CHARGAFF; BANCROFT; STANLEY-BROWN, 1936; FARIAS et al., 2000; ATHUKORALA et al., 2007; ZHANG et al., 2008), peixes (SOUZA et al., 2007), moluscos, equinodermos, ascídias (BURSON et al., 1956; MOURÃO et al., 1996; PAVÃO et al., 1998) etc, também é justificada devido aos efeitos colaterais do uso terapêutico da heparina (extraída de boi e porco), tais como hemorragia e plaquetopenia (THOMAS, 1997), mundialmente utilizada como agente terapêutico (anticoagulante e antitrombótico) na prevenção e tratamento de pacientes acometidos por trombose venosa causada por diferentes etiologias (WEIZT, 1994), motivando assim várias pesquisas utilizando organismos marinhos na busca por novos substitutos para a heparina (MOURÃO; PEREIRA, 1999).

O gênero *Halymenia* C. Agardh (1817) está distribuído nos mares tropicais e são registradas aproximadamente 161 espécies (ABBOTT; HOLLENBERG, 1976; WOMERSLEY, 1994). Até recentemente, as ordens Gigartinales e Cryptonemiales compreendiam cerca de 60% das famílias das rodófitas e dotadas de uma estreita relação entre seus representantes. Entretanto, a separação entre as ordens ainda era mantida pela posição de uma célula generativa auxiliar acessória para Cryptonemiales. Dada à dificuldade na diferenciação destas células, Kraft e Robins (1985) sugeriram provisoriamente reunir as ordens.

A importância no estudo dos PS sugere correlacionar detalhes estruturais com propriedades físico-químicas e/ou atividades biológicas que auxiliem na taxonomia de algas nos critérios clássicos de sistemática (morfologia e microscopia) desses organismos. De forma a contribuir com novos estudos taxonômicos, utilizando PS como marcadores moleculares na identificação de espécies de algas marinhas, duas espécies do gênero *Halymenia* foram investigadas pelo emprego de técnicas da bioquímica comparativa.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS ALGAS MARINHAS

A coleta das espécies, *Halymenia pseudofloresia* Collins & M. Howe e *Halymenia* sp (Halymeniales; Rhodophyta), foi realizada na praia de Flecheiras-Trairí-Ceará, em julho de 2005, a partir de exemplares arribados na zona entre-marés. Logo após a coleta, as algas foram acondicionadas em sacos plásticos e conduzidas ao laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará para os posteriores estudos.

A espécie *H. pseudofloresia* (Figura 1A) pode ser encontrada nas Ilhas do Atlântico (TAYLOR, 1960), na América do Sul (GANESAN, 1990) e nas Ilhas Caribenhas (LITTLER; LITTLER, 2000). A alga apresenta talo cheio de lóbulos contendo membranas gelatinosas, de formato geralmente irregular, podendo atingir de 7 a 36 cm de comprimento. Na estrutura interna há presença de filamentos dispersos na camada medular (TAYLOR, 1960). Macroscopicamente, seu talo se caracteriza por apresentar um formato de fita de largura variável, com ramificação dicotômica na grande maioria de seus ramos e de textura lisa, fixo no substrato por um apressório basal, levando assim a diferenciá-la da espécie *Halymenia* sp, a qual apresenta uma textura lisa em toda sua superfície foleácea expandida e não ramificada (Figura 1B).

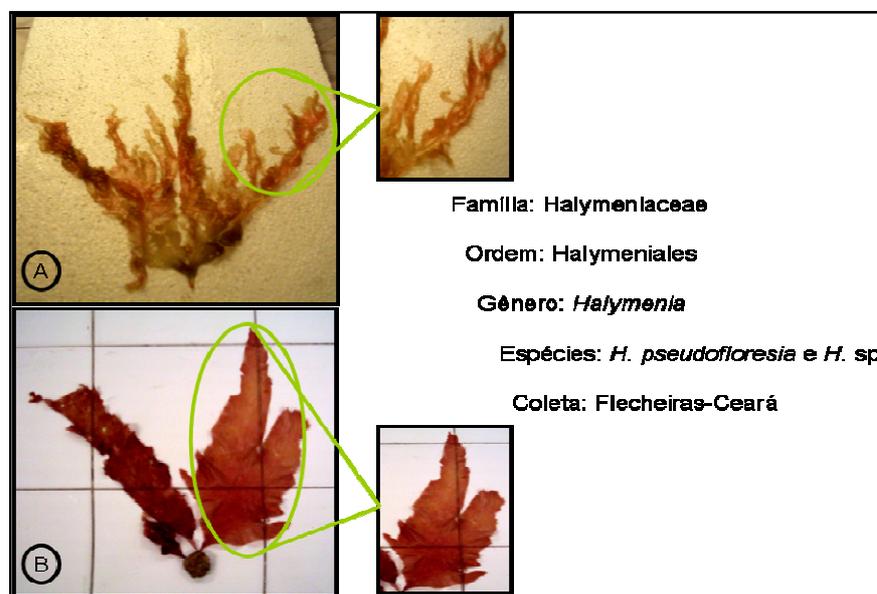


Figura 1 - Algas marinhas vermelhas *Halymenia pseudofloresia* (A), em destaque o talo em formato de fita e as regiões dicotômicas, e *Halymenia* sp (B), mostrando em destaque seu talo foleáceo expandido.

EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS TOTAIS (PST)

Logo após, 5 g de alga seca foram hidratadas (Figura 2) com 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM (AcNa). Em seguida, foram adicionados 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL), sendo a mistura incubada em banho-maria (60°C; 24 h). Após esse período, o material foi filtrado, centrifugado (7.965 × g; 20 min.) e, ao sobrenadante, foram adicionados 16 mL de cloreto cetilpiridínio (CPC) a 10%, para concentração dos PS (24 h; 25 °C). Logo após a precipitação, o material foi lavado (200 mL de CPC 0,05%), dissolvido em 174 mL de NaCl 2M: etanol absoluto (100:15; v/v) e novamente precipitado com a adição de etanol absoluto por 24 horas a 4 °C. Finalmente, o material assim obtido foi lavado com etanol 80% (200 mL; 2 ×), etanol absoluto (200 mL; 1 ×) e seco em estufa durante 24 horas a 60 °C (FARIAS et al., 2000). Os resíduos das extrações foram ré-digeridos com papaína a fim de otimizar o rendimento dos PST de acordo com Bezerra-Neto et al. (2008).

Após esse período, o material foi filtrado, centrifugado (7.965 × g; 20 min.) e, ao sobrenadante, foram adicionados 16 mL de cloreto cetilpiridínio (CPC) a 10%, para concentração dos PS (24 h; 25 °C). Logo após a precipitação, o material foi lavado (200 mL de CPC 0,05%), dissolvido em 174 mL de NaCl 2M: etanol absoluto (100:15; v/v) e novamente precipitado com a adição de etanol absoluto por 24 horas a 4 °C. Finalmente, o material assim obtido foi lavado com etanol 80% (200 mL; 2 ×), etanol

absoluto (200 mL; 1 ×) e seco em estufa durante 24 horas a 60 °C (FARIAS et al., 2000). Os resíduos das extrações foram ré-digeridos com papaína a fim de otimizar o rendimento dos PST de acordo com Bezerra-Neto et al. (2008).

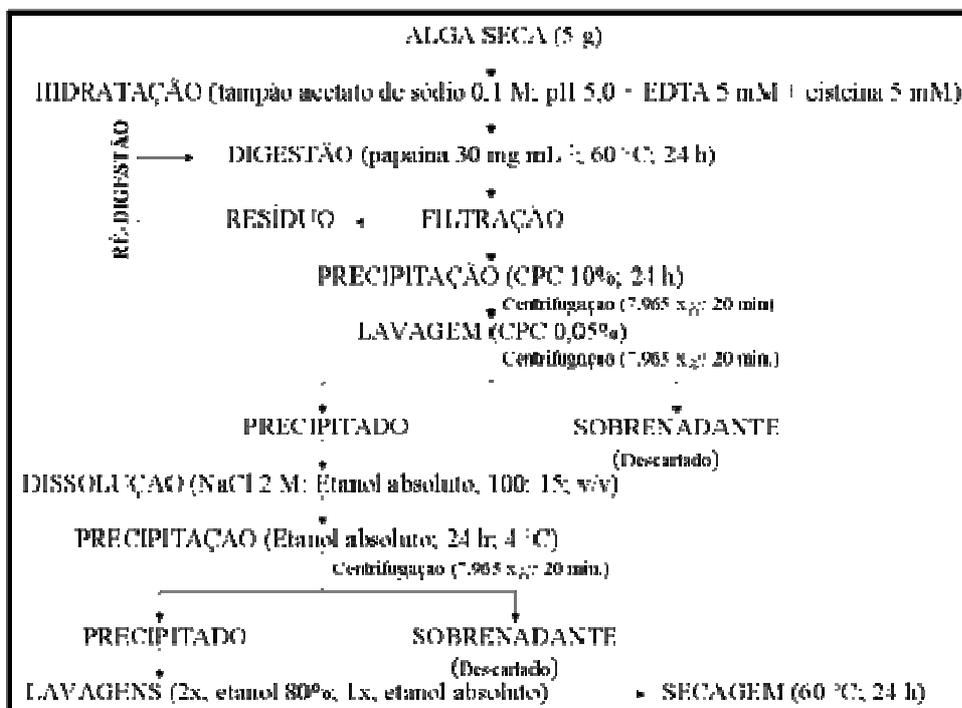


Figura 2 - Fluxograma de extração dos PST. As algas foram lavadas com água destilada, secas ao sol, trituradas em pequenos pedaços e armazenadas até a extração dos PST.

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

Inicialmente, os PST (10 mg) foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose percolada com o tampão de extração (AcNa 0,1 M) até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos, seguido do fracionamento dos PS por eluição com o mesmo tampão AcNa 0,1 M contendo NaCl em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,0 M) utilizando um coletor de frações com fluxo ajustado para 60 mL/h. As frações (5 mL) obtidas foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM) segundo Farndale et al. (1986). As frações de PS obtidas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e concentradas por liofilização para utilização em ensaios posteriores.

DETECÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL E ELETREOFORSE EM GEL DE AGAROSE

A presença de carboidratos neutros totais foi determinada pelo método fenol-sulfúrico segundo Dubois et al. (1956). As frações de PS (15 µg) também foram analisadas em eletroforese em gel de

agarose 0,5% em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). As frações foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após a corrida, os PS presentes no gel foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% e descorado com uma solução de etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v) como descrito por Dietrich e Dietrich (1976).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RENDIMENTO

Foram realizadas três extrações consecutivas para ambas as espécies (Figura 3). Os rendimentos foram semelhantes e sofreram decréscimos marcantes no decorrer das extrações de PST, totalizando 47,14 e 53,96% para *H. pseudofloresia* e *Halymenia* sp, respectivamente, considerando todas as

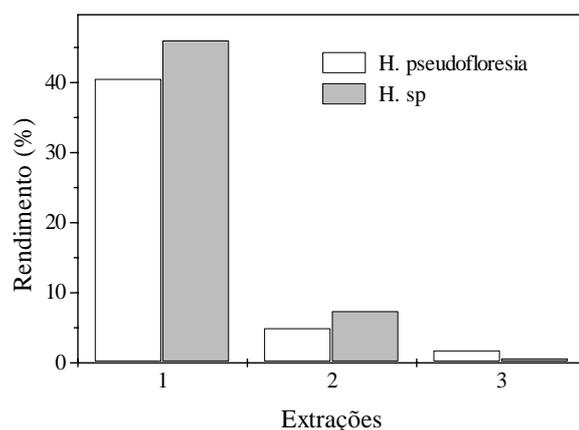


Figura 3 - Rendimento (%), por extração, dos extratos brutos de PST das algas marinhas vermelhas *Halymenia pseudofloresia* e *Halymenia* sp.

extrações. No entanto, a maior quantidade de PST foi obtida durante as primeiras extrações das algas, sendo decrescentes nas demais.

Em trabalhos envolvendo a extração de PST de algas marinhas, polissacarídeos solúveis totais obtidos das algas marinhas vermelhas *Gracilaria cornea* (MELO et al., 2002), *Halymenia floresia* e *G. ornata* (AMORIM, 2005) resultaram, respectivamente, em rendimentos de 21,4; 38,6 e 9,2%. Um rendimento de 22,3% de PST da alga marinha parda *Sargassum polycystum* foi obtido a partir da extração com solvente ácido (CHOTIGEAT et al., 2004). Extrações de polissacarídeos utilizando as feofíceas *Ecklonia cava* (ATHUKORALA et al., 2006) e *Spatoglossum shroederi* (LIMA, 2007) apresentaram rendimentos superiores (38,4 e 41,5%, respectivamente) daqueles obtidos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (13%) por Rodrigues e Farias (2005) empregando-se enzimas na

extração de PST. Como é possível observar, a grande variação nos rendimentos desses compostos implica na utilização de diferentes espécies (LEVRING; HOPPE; SCHMID, 1969) e metodologias empregadas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

No presente estudo, o rendimento das espécies do gênero *Halymenia* superou quando comparado aos trabalhos acima supracitados. Por outro lado, o decréscimo no rendimento no decorrer das extrações foi semelhante quando comparado a outras espécies de algas. As algas *C. racemosa* e *S. shroederii* Rodrigues e Farias (2005) e Lima (2007) também observaram comportamento semelhante durante extrações consecutivas utilizando-se a digestão enzimática de proteínas na extração de PST. No entanto, a primeira espécie diferiu quanto ao número de extratos obtidos (RODRIGUES; FARIAS, 2005). As propriedades espessantes e geleificantes desses compostos (conhecidos com ficocolóides) em muitas espécies de algas marinhas lhes agregam considerável valor comercial em diversas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica (GLICKSMAN, 1983).

PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

Os perfis cromatográficos foram diferentes entre as espécies. Na alga *H. pseudofloresia* (1^a extração), foram separadas cinco frações eluídas com 0,5 (F I); 0,75 (F II); 1,0 (F III); 1,25 (F IV) e 1,50 M (F V) de NaCl, das quais a F I, F II e F III apresentaram as maiores metacromasias em 525 nm (Figura 4A). Este comportamento diferiu em relação à 2^a e 3^a extrações (Figuras 4B e 4C), quando foram observadas diferenças numéricas e na intensidade metacromática das frações.

A espécie *Halymenia* sp também mostrou diferenças marcantes nos perfis revelados entre as extrações e, principalmente, quando comparada à espécie *H. pseudofloresia*. Na 1^a extração (Figura 4D), foram separadas quatro frações eluídas com 0,5 (F I); 0,75 (F II); 1,0 (F III) e 1,25 M (F IV) de NaCl. As frações F II e F III apresentaram as maiores metacromasias as quais também diferiram em relação aos cromatogramas mostrados na 2^a e 3^a extrações de PST (Figuras 4E e 4F), respectivamente. Por outro lado, nas 3^a extrações de ambas as espécies, foram constatadas frações com elevadas metacromasias dentre todas as extrações realizadas, sugerindo que, possivelmente, a técnica utilizada promova a extração de polissacarídeos mais diferenciados e com maior grau de sulfatação. As frações F I, F II e F III (3^a extração), identificadas em ambas as espécies (Figuras 4C e 4F), talvez se justifique como uma característica peculiar dos PS extraídos de *H. pseudofloresia* e *Halymenia* sp., respectivamente.

Diferenças marcantes também foram relatadas por Rodrigues e Farias (2005) e Lima (2007) nos cromatogramas obtidos durante o fracionamento desses compostos em coluna de troca iônica DEAE-

celulose das espécies *C. racemosa* e *S. shroederii*, quando a intensidade metacromática das frações diferiu entre as extrações. Percival e Mcdowell (1967) relataram que algumas separações de

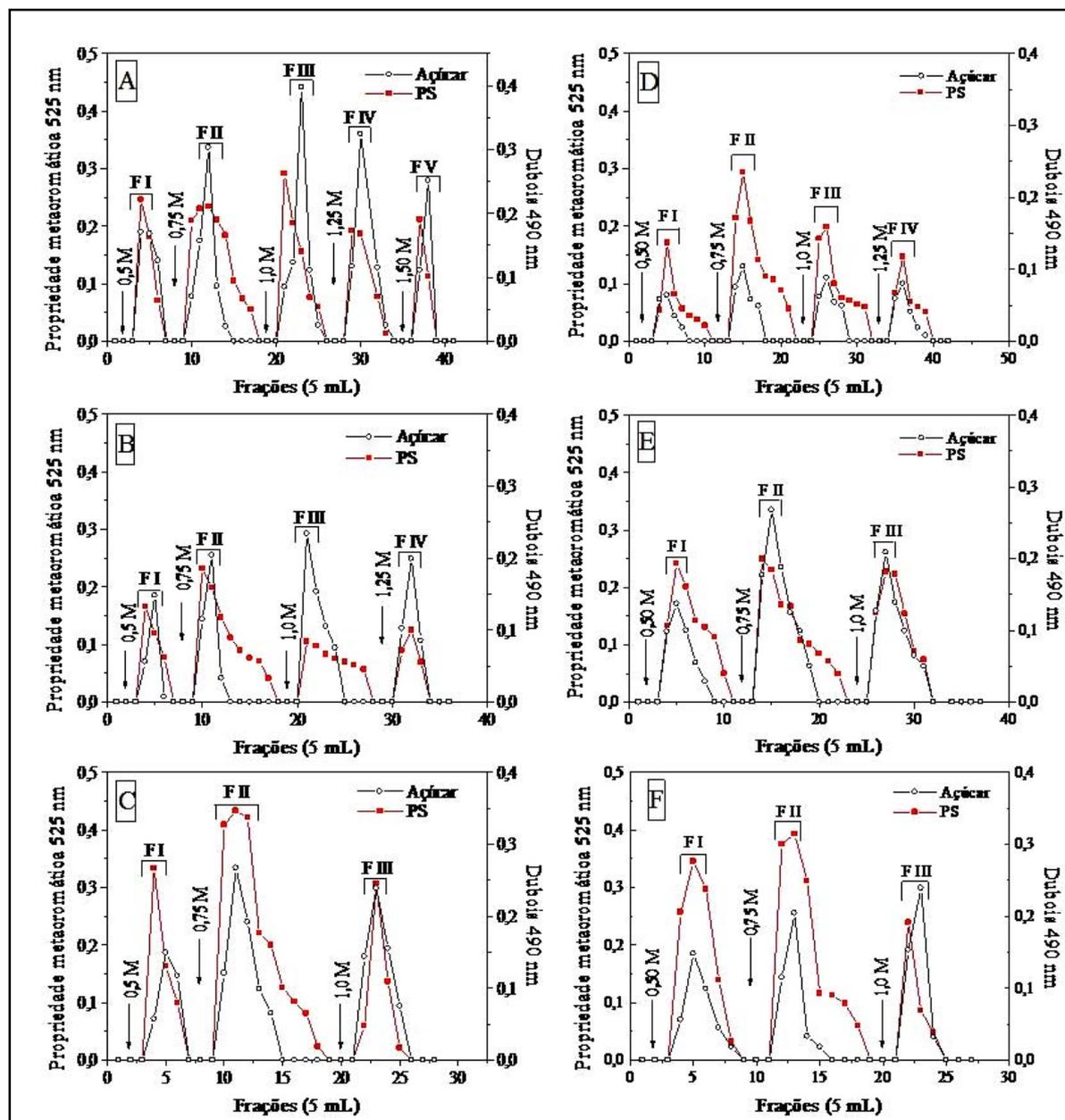


Figura 4 - Cromatogramas dos extratos totais de PST de *Halymenia pseudofloresia* (1^a - A; 2^a - B e 3^a - C) e *Halymenia* sp (1^a - D; 2^a - E e 3^a - F) em coluna de troca iônica DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa 0,1 M. Os PS adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão de AcNa 0,1 M contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,50 M). Os PS foram monitorados com azul-dimetilmetileno a 525 nm. (○—○) açúcar total; (■—■) propriedade metacromática.

polissacarídeos em algas podem ser realizadas mediante a extração diferencial utilizando diferentes solventes, tais como a extração aquosa (fria e/ou quente) e alcalina (fria e/ou quente), rendendo 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).

Neste trabalho, as frações de PS eluídas em DEAE-celulose das algas *H. pseudofloresia* e *Halymenia* sp também apresentaram uma grande presença de carboidratos totais (Dubois), possivelmente em razão da extração de polissacarídeos neutros (Figura 4). Por outro lado, Percival e Mcdowell (1967) relatam que polissacarídeos neutros são raramente ou fracamente retidos em colunas de troca iônica (DEAE-celulose). Portanto, a referida resina foi eficiente na separação dos PS extraídos das espécies utilizadas.

A partir de estudos com a alga marinha verde *C. racemosa*, Rodrigues e Farias (2005) observaram diferenças marcantes na atividade anticoagulante determinada através tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) de PS também obtidos a partir de extrações consecutivas de PST do mesmo tecido algal. Em duas frações eluídas em gel de DEAE-celulose oriundas da quarta extração dos PST foram observados prolongamentos no tempo de coagulação em, no mínimo, 4,6 vezes superiores daquelas separadas do primeiro extrato de *C. racemosa*.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese em gel de agarose revelou diferenças entre o grau de purificação das frações, bem como no padrão de cargas entre o extrato bruto (EB) de PST e as frações de PS obtidas de uma única extração (Figura 5). As frações F II; F III e F IV (1ª extração) mostraram um padrão de cargas bastante polidisperso e semelhantes entre si, resultando assim uma baixa purificação (Figura 5A). Por outro lado, quando as frações F I; F II e F III obtidas na 3ª extração percorreram no gel (Figura 5B), foram observadas bandas homogêneas, indicando uma maior resolução (*Halymenia* sp).

As frações de PS da alga *H. pseudofloresia* apresentaram características semelhantes durante sua migração eletroforética quando comparadas a *Halymenia* sp. No entanto, na 3ª extração, um padrão eletroforético distinto foi observado entre o EB e as frações (Figura 5E). As diferenças das bandas do EB e a ausência de uma delas quando eluídas no gel de DEAE-celulose reforça o fato da elevada metacromasia (Figura 4C), promovendo uma maior interação da banda inferior (mais carregada) em relação à superior. As espécies estudadas também mostraram uma densidade de cargas semelhante à heparina não-fracionada (Figuras 5C e 5F). As diferenças encontradas dessas macromoléculas (*H.*

pseudofloresia e *Halymenia* sp) se sugerem que o grau de complexidade esteja se reduzindo e que talvez ajude na caracterização estrutural desses polímeros complexos e heterogêneos (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008).

As diferenças no grau de resolução desses polissacarídeos pode ser resultado de mudanças dos padrões químicos nas estruturas dessas moléculas, ajudando talvez a compreender melhor as relações das funções biológicas com as estruturas desses compostos (MOURÃO; PEREIRA, 1999; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008).

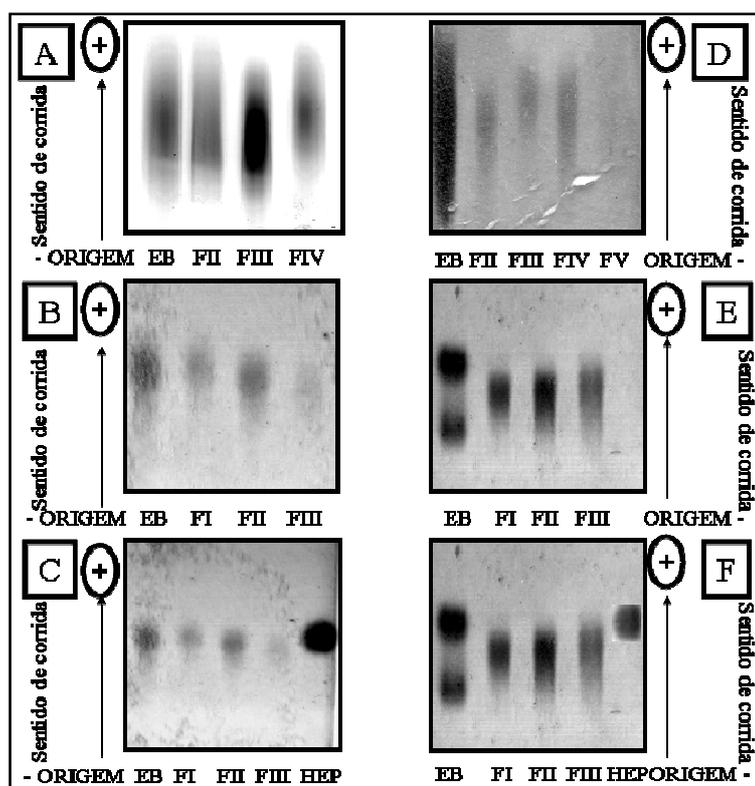


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose das frações de *Halymenia* sp (A e B) e *Halymenia pseudofloresia* (D e E) das 1^a e 3^a extrações, respectivamente, e quando comparadas a heparina não-fractionada (C e F). Os extratos brutos (EB) de PST, frações (Fn) e heparina (HEP) não-fractionada foram corados com azul de toluidina 0,1%.

Assim, a otimização do rendimento a partir de extrações consecutivas, a avaliação dos perfis cromatográficos em coluna de DEAE-celulose e a revelação do grau de purificação por eletroforese, foi possível extrair PS distintos e alocados em diferentes camadas do tecido algal das rodofíceas marinhas *H. pseudofloresia* e *Halymenia* sp. A detecção destas biomoléculas talvez possa ser considerada como uma estratégia valiosa em estudos taxonômicos de algas marinhas e identificação de novos agentes farmacológicos.

Assim, a otimização do rendimento a partir de extrações consecutivas, a avaliação dos perfis cromatográficos em coluna de DEAE-celulose e a revelação do grau de purificação por eletroforese, foi possível extrair PS distintos e alocados em diferentes camadas do tecido algal das rodofíceas marinhas *H. pseudofloresia* e *Halymenia* sp. A detecção destas biomoléculas talvez possa ser considerada como uma estratégia valiosa em estudos taxonômicos de algas marinhas e identificação de novos agentes farmacológicos.

CONCLUSÃO

Extrações consecutivas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas do gênero *Halymenia*, utilizando técnicas da bioquímica comparativa, revelam diferenças moleculares marcantes entre as duas espécies estudadas. O emprego da técnica ao longo de diferentes extrações poderá ser mais uma estratégia no processo de purificação destas biomoléculas com vista a sua aplicação na taxonomia de algas e identificação de novos fármacos presentes nesses organismos.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, I.A.; HOLLENBERG, G.J. *Marine algae of California*. Stanford: Stanford University Press, 1976. 827p.
- 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. 99f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- AQUINO, R.S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology*, v.15, n.1, p.11-20, 2005.
- 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. et al. An anticoagulant 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 de Engenharia de Pesca*, v.3, n.2, p.50-62, 2008.

- BURSON, S.L. et al. Isolation and purification of mactins, heparin-like anticoagulants from Mollusca. *Journal of the American Chemical Society*, v.78, n.22, p.5874-5878, 1956.
- CÁSSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in vertebrates, Bethesda. *Journal of Biological Chemistry*, v.252, n.7, p.2254-2261, 1977.
- CHARGAFF, F.; BANCROFT, F.W.; STANLEY-BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition on blood clotting by substances high molecular weight. *Journal of Biology Chemistry*, v.115, p.155-161, 1936.
- CHOTIGEAT, W. et al. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, v.233, n.1-4, p.23-30, 2004.
- DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical Biochemistry*, v.70, n.2, p.645-647, 1976.
- DUBOIS, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- 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. *Biochimistry et Biophysica Acta*, v.883, n.2 p.173-177, 1986.
- GENESAN, E.K. *A catalog of benthic marine algae and sea grasses of Venezuela*. Fondo Editorial Conicit. 1990. 237p.
- GLICKSMAN, M. *Food hydrocolloids. Natural plant exudates – seaweed extracts*. Baton Raton: CRC Press, 1983.
- HUSSEIN, M.M.D.; HELMY, W.A.; SALEM, H.M. Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivatives. *Phytochemistry*, v.48, n.3, p.479-484, 1998.
- KJELLÉN, M.; LINDAHL, U. Proteoglycans: Structures and interactions. *Annual Review Biochemistry*, v.60, p.443-475, 1991.

- KRAFT, G.T.; ROBINS, P.A. Is the order Cryptonemiales (Rhodophyta) defensible? *Phycology*, v.24, p.67-77, 1985.
- LEVRING, T.; HOPPE, H.A.; SCHMID, O.J. *Marine algae. A survey of research and utilization*. Botanical Marine Handbook, 1969. 421p.
- LITTLER, D.S.; LITTLER, M.M. *Caribbean reef plants, an identification guide to the reef plants to the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico*. Washington: Offshore Graphics. 2000. 542p.
- 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, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- MATHEWS, M.B. Polyanionic proteoglycans. In: KLEINZELLER; SPRINGER.; G.F; WITMANN, H.G. (Eds). *Connective tissue: macromolecular structure and evolution*. Berlin: Springer-Verlaq, 1975. p.93-125.
- MELO, M.R.S. et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers*, v.49, n.4, p.491-498, 2002.
- 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.
- MOURÃO, P.A.S. et al. 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*, v.27, n.39, p.23973-23984, 1996.
- PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. O (Ed). *The polysaccharides* New York: Ed. Academic Press, 1983. p.195-285.
- PAVÃO, M.S.G. et al. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, n.43, p.27848-27857, 1998.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press, 1967. 219p.
- PEREIRA, M.G. et al. 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.2015-2023, 2005.

- TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais marinhos. In: PEREIRA, R. C.; A. SOARES-GOMES (Ed.). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro (RJ): Ed. Interciência, 2002. cap. 12, p.249-279.
- RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, XIII, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: Centro de Convenções do Ceará, 2005. p.1693-1701.
- SZE, P. *A biology of the algae*. New York: McGraw-Hill, 1997. 278p.
- SOUZA, M.L.S. et al. Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v.147, n.3, p.387-394, 2007.
- TAYLOR, W.R. *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of Americas*. The University of Michigan, 1960. 870p.
- THOMAS, D.P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding?. *Thrombosis and Haemostasis*, v.78, n.6, p.1422-1425, 1997.
- VILLANUEVA, R.D.; PAGBA, C.V.; MONTANO, N.E. Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides* Harvey. *Botanica Marina*, v.40, p.369-372, 1997.
- WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. *Drugs*, v.48, p.485-497, 1994.
- WOMERSLEY, H.B.S. *The marine benthic flora of southern Australian*. Australian Biological Resources Study: Canberra, 1994. 508p.
- 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.428-434, 2008. ❁