



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Luciano de Sousa Chaves

**Polissacarídeos da Alga Marinha *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira):
Estrutura e Avaliação Toxicológica**

**Fortaleza
Junho de 2008**

LUCIANO DE SOUSA CHAVES

**Polissacarídeos da Alga Marinha *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira):
Estrutura e Avaliação Toxicológica**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas

**Fortaleza
Junho de 2008**

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)

- C439p Chaves, Luciano de Sousa.
Polissacarídeos de Alga Marinha *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira): Estrutura e Avaliação Toxicológica / Luciano de Sousa Chaves. – 2008.
81 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2008.
Orientação: Profa. Dra. Ana Lucia Ponte Freitas.
1. Alga marinha. 2. Gracilaria. 3. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

“Estudante, eis um título que apenas abandonamos no túmulo”.
(Jean Guilton)

LUCIANO DE SOUSA CHAVES

**Polissacarídeos da Alga Marinha *Gracilaria birdiae* (Plastino e Oliveira):
Estrutura e Avaliação Toxicológica**

Esta dissertação foi desenvolvida como parte dos pré-requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade

Aprovada em ____ / ____ / ____

Profa. Dra. Ana Lucia Ponte Freitas
Orientadora da Dissertação
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Centro de Ciências da Saúde
Universidade de Fortaleza

Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica
Universidade Federal do Ceará

Aos maiores orientadores da minha vida, Francisco e Socorro,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me proporcionar a vida, a saúde e a tranqüilidade para superar os obstáculos impostos pela vida.

À professora. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas que proporcionou minha iniciação científica e acompanhou meus passos desde o início, não apenas com valiosos conselhos acadêmicos, mas também, com orientações para a vida, sempre enfatizando o lado espiritual e humano do profissional.

Professora. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira que abriu as portas da Universidade de Fortaleza para a realização da avaliação toxicológica, pelos conselhos que muito acrescentaram durante os experimentos e pela valiosa presença na banca de avaliação.

À Professora. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula por proporcionar o desenvolvimento de caracterização química no Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará e pela disponibilidade e conselhos imprescindíveis a esse trabalho.

Ao Prof. Edilberto Rocha Silveira por disponibilizar o Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) para a realização dos experimentos de RMN

À professora Gláucia, especialista em histopatologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Fortaleza, pela colaboração nas avaliações histopatológicas desenvolvidas nesse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará pela colaboração na minha formação acadêmica durante o curso de mestrado, em especial ao professor Renato de Azevedo Moreira pelo auxílio na elaboração do projeto dessa dissertação, bem como pelos valiosos conselhos ao longo do curso de mestrado.

Ao meu pai, Francisco e à minha mãe, Socorro, pelo exemplo de honestidade, perseverança, força e equilíbrio. Obrigado pela segurança e a certeza de que nunca caminho sozinho.

À minha esposa Fernanda, pelo apoio incondicional aos meus sonhos e pela compreensão e serenidade mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigado por proporcionar a segurança de ter ao meu lado uma pessoa equilibrada, honesta e batalhadora, porém sem perder a sensibilidade e a delicadeza.

Aos meus filhos, Luana e Luis Fernando, por me proporcionar o sentimento de ser esperado todas as noites, com sorrisos cativantes e sinceros que somente as crianças são capazes de expressar.

Ao meu irmão, Fabiano, pela dedicação e perseverança aos objetivos acadêmicos que sem dúvida, é um exemplo que me norteia desde o início da faculdade.

À minha irmã, Marciana, pelo apoio e imensurável ajuda à nossa família no dia-a-dia, principalmente nos momentos em que eu tive que me ausentar.

À Deise e família, pela presteza e compreensão à minha família e, principalmente, por proporcionar a segurança de que meus filhos estão em boas mãos.

Aos meus amigos do Laboratório de Algas Marinhas, em especial ao meu amigo Dráulio pelo companheirismo e conselhos desde o início da graduação, e à Cíntia, pela amizade e pela presença marcante em grande parte dessa caminhada e cuja ajuda é inestimável.

Às Profas. Geane, Pablina, Leônia, Dulcilene e Marina do Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará pela inestimável ajuda nos experimentos de caracterização química.

Aos meus colegas de mestrado que me acompanharam durante essa jornada, especialmente à Edcarlos, que além da amizade, me ajudou a realizar os estudos de viscosidade.

Às alunas de graduação do Curso de Farmácia da UNIFOR, Gilvânia, Isabele e Cíntia pelo apoio e disponibilidade durante os experimentos de toxicologia.

Aos técnicos da Universidade de Fortaleza, especialmente a Conceição, pelo apoio geral no Laboratório de Bioquímica, a Beth pela colaboração na confecção das lâminas histológicas e a Orleandro pela ajuda com os animais de laboratório.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica pela colaboração e convivência diária durante o curso de mestrado.

INSTITUIÇÕES COLABORADORAS

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, sede do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e onde este trabalho foi executado.

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará cujo foi realizado grande parte do estudo da estrutura química do polissacarídeo.

Centro de Ciências da Saúde da Universidade de Fortaleza (CCS-UNIFOR) onde foram realizadas as análises de toxicidade aguda e subcrônica e a análise da viscosidade do polissacarídeo.

Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) onde foram realizados parte do estudo da estrutura química do polissacarídeo através de experimentos de RMN.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro por meio da bolsa e auxílios imprescindíveis à realização desse trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos convênios com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

RESUMO

Algas marinhas são seres classificados no reino protista, predominantemente aquáticos e com grande capacidade adaptativa. Encontradas em todas as regiões do planeta, as algas desempenham importante papel ecológico e econômico, representando um grande potencial de biorrecursos. A alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, submetida à extração aquosa de polissacarídeos, apresentou rendimento de 6,4% na fração extraída à temperatura ambiente (25-28 °C) (Gb-f), e 56 % na fração extraída a 100 °C (Gb-q). O teor de sulfato nas frações Gb-f e Gb-q apresentaram valores de 6,4 e 1,36%, respectivamente. O grau de sulfatação de Gb-f foi de 0,22, enquanto Gb-q apresentou valor de 0,04. O conteúdo protéico encontrado nas amostras Gb-f e Gb-q foi de 7,6 e 2,0 %, respectivamente. As amostras foram caracterizadas quimicamente por cromatografia de permeação em gel (GPC), espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) e por ressonância magnética nuclear (RMN). Os cromatogramas de GPC de ambas as amostras apresentaram semelhanças e características típicas de polissacarídeos das algas vermelhas. A fração Gb-f apresentou um pico e um ombro com massas moleculares estimadas em $1,11 \times 10^6$ e $1,26 \times 10^5$ g/mol, respectivamente, enquanto a fração Gb-q também apresentou um pico e um ombro com massas moleculares estimadas em $3,18 \times 10^5$ e $1,09 \times 10^5$ g/mol, respectivamente. Os espectros de infravermelho das frações Gb-f e Gb-q apresentaram perfis semelhantes, com as bandas características de agarocolóides, mais especificamente, do tipo agarana, e com traços que evidenciam a presença de proteínas. RMN 1 D e 2 D foram empregados para a caracterização estrutural das amostras Gb-f e Gb-q e, revelaram que a estrutura do polissacarídeo é composta por segmentos de (1→3)-β-D-galactopiranosil ligada a (1→4)-α-L-anidrogallactopiranosil. A avaliação toxicológica aguda, em camundongos, demonstrou ausência de mortalidade e de sinais de toxicidade nos indivíduos submetidos ao tratamento com polissacarídeo, por via intraperitoneal, nas doses de 0,5; 1,0 e 2,5 mg/100g de massa corpórea. A avaliação toxicológica sub-crônica também não evidenciou sinais de toxicidade em ratos, na dose de 50 mg/100g de massa corpórea, por via oral, tendo como parâmetros avaliados: acompanhamento dos massa dos animais durante 90 dias de tratamento, análises hematológicas e bioquímicas (contagem de leucócitos, dosagem de glicose, proteínas totais,

creatinina, colesterol, AST e ALT) e histopatológicas (baço, fígado, rim, pulmão, coração, estômago e intestino).

ABSTRACT

Seaweeds beings are classified in the Kingdom Protist, predominantly aquatic and with great adaptive capacity. Found in all regions of the planet, algae play an important role ecological and economic, representing a great potential for biorrecursos. The red seaweed *Gracilaria birdiae*, submitted to aqueous extraction of polysaccharides, showed yield of 6.4% in the cold extraction (25-28 °C) (Gb-f), and 56 % in the hot extraction, at 100 °C (Gb-f). The sulfate content of the fractions Gb-f and Gb-q showed values of 6.4 and 3.6 %, respectively. The sulfate degree of Gb-f was 0.22, whereas Gb-q showed value of 0.04. The protein content in the samples Gb-f e Gb-q was 7.6 and 2.0%, respectively. The samples were characterized by Gel Permeation Chromatography (GPC), Infrared (FT-IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. The GPC chromatograms of both samples showed similarity and typical characteristics of red seaweeds polysaccharides. The fraction Gb-f showed a peak and a shoulder with molecular weight of 1.11×10^6 and 1.26×10^5 g/mol, respectively, whereas, the fraction Gb-q showed both a peak and a shoulder, with molecular weight of 3.18×10^5 and 1.09×10^5 g/mol, respectively. The infrared spectra of Gb-f and Gb-q presented similar profiles, with bands characteristics of agarocolloids, more specifically agaran-like, with evidence of protein. NMR 1 D and 2 D were employed to the structural characterization of the samples Gb-f and Gb-q and revealed that they were composed by (1→3)-β-D-galactopyranosyl linkage to (1→4)-α-L-anhydrogalactopyranosyl segments. The acute toxicological evaluation in mice demonstrated the absence of signs of toxicity with no mortality in the groups submitted to polysaccharides treatment, by intraperitoneal way, at doses of 0.5; 1.0 e 2.5 mg/100g of body weight. The sub chronic toxicological analysis evidenced no toxicity signs in rats, in the 50 mg/g body weight dosage, by oral way. The parameters evaluated were: animal body followed during 90 days of experiment, hematological and chemical analysis (counting of leukocytes, glucose, total protein, creatinin, cholesterol, AST and ALT dosages) and hystopatological analyses (spleen, liver, kidney, lung, hearth, stomach and gut).

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Foto de um espécime de <i>Gracilaria birdiae</i>	22
FIGURA 2: Representação esquemática estrutural das galactanas de algas vermelhas.....	27
FIGURA 3: Padrão estrutural do dissacarídeo presente nas agaranas.....	29
FIGURA 4: Padrão estrutural da agarose (a) e de seu precursor biológico natural (b).....	30
FIGURA 5: Padrão estrutural do dissacarídeo presente nas carragenanas.....	31
FIGURA 6: Representação esquemática estrutural das galactanas DL-híbridas de algas vermelhas.....	33
FIGURA 7: Fluxograma de extração dos polissacarídeos da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	41
FIGURA 8: Cromatograma de GPC do polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> extraído à temperatura ambiente.....	50
FIGURA 9: Cromatograma de GPC do polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> extraído a 100° C.....	50
FIGURA 10: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração extraída temperatura ambiente de <i>G.birdiae</i>	53
FIGURA 11: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração	

extraída a 100° C ambiente de <i>G.birdiae</i>	53
FIGURA 12: Espectro de RMN de ¹ H do polissacarídeo de <i>G. birdie</i> : (a) extraído à frio e (b) extraído à 100° C.	55
FIGURA 13: Espectro de RMN de ¹³ C do polissacarídeo de <i>G. birdiae</i>	56
FIGURA 14: Espectro de DEPT de <i>G. birdiae</i>	57
FIGURA 15: Espectro de HMQC do polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> : (a) extraído à temperatura ambiente e (b) extraído a 100° C.....	59
FIGURA 16: Espectro Cosy do polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> : (a) extraído à temperatura ambiente e (b) extraído a 100° C.....	60
FIGURA 17: Efeito da concentração na viscosidade relativa da solução de polissacarídeo de <i>G.birdiae</i>	63
FIGURA 18: Acompanhamento do peso corpóreo dos ratos	65
FIGURA 19: Número total de leucócitos totais (10 ³ cels/μL).....	66
FIGURA 20: Dosagem de glicose (mg/dL).....	66
FIGURA 21: Dosagem de proteínas totais (mg/dL).....	67
FIGURA 22: Dosagem de creatinina (mg/dL).....	67
FIGURA 23: Dosagem de colesterol total (mg/dL).....	68
FIGURA 24: Níveis de AST (U/L).....	68
FIGURA 25: Níveis de ALT (U/L).....	69

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Principais características dos Filos Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta.....	20
TABELA 2: Codificação dos resíduos de açúcar e grupos substituintes presentes nas galactanas (KNUTSEN <i>et al</i> , 1994).	28
TABELA 3: Nomenclatura alternativa para as carragenanas proposta por Knutsen <i>et al</i> (1994), modificada por Cauduro <i>et al</i> . (2000).....	32
TABELA 4: Rendimento e análises bioquímicas dos polissacarídeos de <i>Gracilaria birdiae</i> extraída a 25 e 100° C.....	46
TABELA 5: Rendimento de ágar de algumas espécies de <i>Gracilaria</i>	47
TABELA 6: Massas molares de cada pico das extrações de polissacarídeos de <i>G. birdiae</i> extraída à temperatura ambiente e a 100° C.....	51
TABELA 7: Atribuições no espectro do infravermelho para polissacarídeos de algas marinhas, sobretudo de rodófitas.....	52
TABELA 8: Comparação entre agar de diferentes espécies de <i>Gracilaria</i>	58
TABELA 9: Assinalamentos de referência do espectro de RMN de ¹³ C.....	61
TABELA 10: Assinalamentos de RMN de ¹ H e ¹³ C para resíduos de Gb-f....	62
TABELA 11: Assinalamentos de RMN de ¹ H e ¹³ C para resíduos de Gb-q....	62

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

COSY	Correlated Spectroscopy
D ₂ O	Água deuterada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DS	Degree sulfate (Grau de sulfatação)
EtOH	Etanol
FT-IR	Fourier Transformed – Infrared (Transformada de Fourier – Infravermelho)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy
Gb-f	Polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> extraído a frio (25-28° C)
Gb-q	Polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> extraído a quente (100° C)
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

	Página
1. Introdução.....	18
1.1. Características Gerais das Algas.....	18
1.1.1. Descrição Taxonômica e Morfológica de <i>Gracilaria birdiae</i>	21
1.1.2. Importância Econômica e Ecológica das Algas Marinhas.....	23
1.2. Algas Vermelhas.....	25
1.3. Galactanas Sulfatadas de Rhodophytas.....	26
1.3.1. Agaranas.....	28
1.3.2. Carragenanas.....	30
1.3.3. Híbrido D/L	33
1.4. Considerações Teóricas sobre Viscosidade dos Fluidos.....	34
1.5. Considerações Teóricas sobre Toxicidade.....	36
2. Objetivos.....	38
3. Material e Métodos.....	39
3.1. Reagentes.....	39
3.2. Algas Marinhas.....	39

3.3. Animais.....	39
3.4. Mecanismo de Extração dos Polissacarídeos de <i>G. birdiae</i>	40
3.5. Determinação do Rendimento da Extração de <i>G. birdiae</i>	42
3.5.1. Dosagem de Carboidratos.....	42
3.5.2. Dosagem de Proteínas.....	42
3.5.3. Dosagem de Sulfato.	42
3.6. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	43
3.7. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	43
3.8. Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C e ^1H	43
3.9. Ensaio da Viscosidade	44
3.10. Avaliação Toxicológica.....	44
3.10.1. Toxicidade Aguda.....	44
3.10.2. Toxicidade Subcrônica.....	45
4. Resultados e Discussão.....	46
4.1. Extração, Rendimento e Análises Químicas dos Polissacarídeos de <i>G. birdiae</i>	46
4.2. Caracterização Química dos Polissacarídeos de <i>G. birdiae</i>	48
4.2.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	48
4.2.2. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho.....	51
4.2.3. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H	54
4.2.4. Viscosidade Intrínseca da Solução do Polissacarídeo de <i>G. birdiae</i>	63
4.3. Avaliação Toxicológica do Polissacarídeo de <i>G. birdiae</i>	64
4.3.1. Toxicidade Aguda.....	64
4.3.2. Toxicidade Sub-crônica.....	64
4.3.2.1. Variação do Peso Corporal dos Animais.....	64

4.3.2.2. Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos.....	65
4.3.2.3. Avaliação Histopatológica.....	69
5. Conclusão.....	71
6. Referências Bibliográficas.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características Gerais das Algas

O conjunto de seres vivos classificados como alga apresenta-se com características bastante diferenciadas. O termo algas, *lato sensu*, compreende um grupo artificial de organismos com poucas características em comum, senão o fato de serem, predominantemente, aquáticos, desprovidos de um tecido constituído de células estéreis que envolvem os órgãos de reprodução, e de um sistema diferenciado para condução de água. Por essa razão, é considerado um grupo polifilético e não constituem uma categoria taxonômica definida. Dessa forma, as algas chegam a ser classificados em três grupos distintos, tradicionalmente conhecidos como Monera, Protista e Plantae (BHATTACHARYA; MEDLIN, 1998; SOGIN *et al.*, 1989).

A aparente semelhança entre algas e plantas contribuiu para que esses grupos de seres vivos fossem classificados no mesmo reino até a década de 1980. Porém, análises estruturais mais aprofundadas revelam que, apesar das aparências, algas e plantas diferenciam-se principalmente quanto à estrutura e fisiologia da reprodução. Nas algas unicelulares os próprios organismos desempenham o papel de gametas; em algumas algas multicelulares, os gametas podem ser produzidos em compartimentos unicelulares especializados, chamados gametângios; em outras macroalgas, os gametângios são multicelulares, e cada célula gametangial é fértil, ou seja, podem produzir um gameta. Nenhuma dessas características é compartilhada com musgos, hepáticas ou plantas vasculares (BOLD; WYNNE, 1985)

Atualmente, todas as algas (macroscópicas e microscópicas) estão classificadas no reino Protista. As Cianobactéria que são algumas vezes erroneamente chamadas de “algas azuis” estão classificadas no reino Monera. O termo informal “alga” é usado para organismos eucariontes e fotossintetizantes diferentes de plantas, e para Cianobactéria (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Embora exista controvérsia com relação à taxonomia das algas podemos classificá-las grosseiramente, de acordo com o tamanho, em dois grandes grupos: as microalgas, com

tamanho microscópico, e as macroalgas, com dimensões que variam de alguns milímetros a algumas dezenas de metros (PANORAMA DA AGRICULTURA, 1997).

Uma segunda classificação, esta mais crítica, que considera características estruturais, funcionais e reprodutivas, e divide as macroalgas em três grupos: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (TABELA 1).

TABELA 1. Principais características dos Filos Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Filo	Número de Espécies	Pigmentos Fotossintetizantes	Produtos de Reserva (Carboidrato)	Componente da Parede Celular	Hábitat
Rhodophyta (algas vermelhas)	4.000-6.000	Clorofila <i>a</i> ; ficobilinas; carotenóides	Amido das florídeas	Microfibrilas de celulose imersas em uma matriz (geralmente galactanos); depósitos de carbonato de cálcio em muitas espécies	Predominantemente marinhas, aproximadamente 100 espécies de água doce; muitas espécies tropicais
Phaeophyta (algas pardas)	1.500	Clorofilas <i>a</i> e <i>c</i> ; carotenóides, principalmente fucoxantina	Laminarina, manitol	Celulose embebida em matriz mucilagínosa de algina	Predominantemente marinho; abundantes em águas oceânicas frias das regiões temperadas e polares
Chlorophyta (algas verdes)	17.000	Clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> ; carotenóides	Amido	Glicoproteínas, polissacarídeos não-celulósicos ou celulose	Maioria aquática, de água doce ou marinha; muitas apresentando relações simbióticas

Numa abordagem evolutiva, segundo Round (1983), as algas marinhas representam um grupo no qual originou todos os grupos de vegetais, desde as Criptógamas e, mais recentemente as Fanerógamas. Os mecanismos biológicos básicos e as vias metabólicas são evidências que atestam essa ancestralidade, apesar das disparidades entre os aspectos morfológicos, citológicos e reprodutivos.

Atualmente, acredita-se que há cerca de 150.000 espécies de algas marinhas, dentre as quais, mais de 30.000 se encontram taxonomicamente classificados. Isso representa um dos maiores biorrecursos do planeta e demonstra o grau de adaptação desses seres vivos.

1.1.1. Descrição Taxonômica e Morfológica do gênero *Gracilaria*

O gênero *Gracilaria* encontra-se distribuído por todo o mundo, desde climas tropicais a temperados (GARGIULO *et al.*, 1992). Historicamente, a classificação desse gênero foi marcada por inúmeras controvérsias. Segundo Papenfuss (1966), os gêneros *Gracilaria* e *Gracilariopsis* seriam sinônimos. Posteriormente, Fredericq e Hommersand (1989a) propuseram que os dois gêneros poderiam ser considerados distintos. A separação foi confirmada (STEENTOFT *et al.*, 1995; GOFF, MOON, COLEMAN, 1994) baseada em análises moleculares e revisada por Bird (1995). Apesar das características semelhantes entre esses dois gêneros, a diferença marcante encontra-se na presença de um tecido nutritivo nas células férteis de *Gracilariopsis*, enquanto no gênero *Gracilaria* esse tecido não é encontrado (FREDERICQ; HOMMERSAND, 1989b).

As algas que compõem o gênero *Gracilaria* são organismos cilíndricos, de coloração vermelho-vinácea, de até 46 cm de comprimento, apresentando um apressório de onde partem um ou mais ramos cilíndricos com ramificações pseudodicotômicas irregulares, freqüentemente unilaterais e de segunda ordem. O talo tem organização microcistideada com células pequenas na medula. Os espermatângios estão reunidos em conceptáculos na forma de criptas fundidas do tipo *henriquesiana* (*sensu* Yamamoto 1984). Os cistocarpos possuem uma constrição basal nítida, ostíolo proeminente e

carposporófito com ampla região de contato com o gametófito. A célula de fusão é extremamente ramificada. (YAMAMOTO, 1984 *apud* URZI; PLASTINO, 2001).

A espécie *Gracilaria birdiae* foi coletada para a classificação na praia do Guagiru, cidade de Trairí (3°28'S, 39°25'W), Ceará, Brasil classificada por E.M. Plastino e E.C. Oliveira (2002). Porém, a alga utilizada nesse trabalho foi proveniente de cultivo na praia de Flexeiras (FIGURA 1), também localizada no município de Trairí.

Reino Protista

Divisão Gracilariales

Família Gracilariaceae

Gênero *Gracilaria*

Espécie *Gracilaria birdiae*



FIGURA 1: Foto de um espécime de *Gracilaria birdiae*

1.1.2. Importância Econômica e Ecológica das Algas Marinhas

A grande diversidade biológica das algas marinhas e sua ocorrência em praticamente todos os ambientes do planeta demonstram a importância desses seres vivos para os ecossistemas. As algas compõem a base da cadeia alimentar dos mares e oceanos. As microalgas, juntamente com as cianobactérias, fazem parte do fitoplâncton, que em conjunto com o zooplâncton, formado por crustáceos e larvas de animais de diferentes filos, compõem o plâncton. No ambiente marinho, peixes pequenos e até as grandes baleias dependem diretamente do plâncton. As algas marinhas bentônicas ocorrem de alguns centímetros até vários metros de tamanho e desempenham papel semelhante às plantas no ambiente terrestre atuando como produtores (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Através da fotossíntese as algas realizam três importantes processos: primeiro, ocorre a liberação de gás oxigênio, indispensável para respiração celular dos organismos heterotróficos. Segundo, ocorre produção de biomassa (glucose) que desempenha importante papel energético e estrutural (com polissacarídeos da parede celular e da matriz extracelular). Por último, o processo fotossintético influencia o ciclo do carbono, pois ocorre consumo de dióxido de carbono (CO_2), que será posteriormente fixado na produção de carboidratos ou ainda na forma de carbonato de cálcio. Esse processo pode levar à diminuição dos níveis de CO_2 atmosférico e à deposição de carbonato de cálcio no assoalho oceânico o qual é o principal responsável pelos depósitos de petróleo dos mares (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Entretanto, algumas espécies de algas produzem toxinas que podem causar sérios problemas ambientais e econômicos, sobretudo na aquicultura, uma vez que esses metabólitos podem afetar diretamente camarões e moluscos bivalves (ANDERSON *et al.*, 2002).

As algas marinhas e seus derivados também têm presença marcante na vida dos seres humanos, sendo consumidas habitualmente na Ásia e ocasionalmente em outros países do mundo (NISIZAWA *et al.*, 1987). Algas marinhas são ricas em polissacarídeos, minerais, e vitaminas. O conteúdo de proteína geralmente é mais alto

nas algas vermelhas que nas algas pardas (MABEAU; FLEURANCE, 1993; CARDOZO *et al.*, 2007). Como exemplo dos gêneros mais explorados como alimentos podemos citar a *Ulva* (alga verde), *Porphyra*, conhecida popularmente como nori (alga vermelha) e *Kelpi* (alga parda) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Com o aumento da demanda por algas, tanto para o consumo *in natura*, como para a extração, purificação e comercialização de componentes algais, desenvolveram-se várias tecnologias de cultivo, principalmente de espécies com maior interesse industrial. Muitas vezes, as algas cultivadas representam importante papel econômico em determinadas regiões.

As indústrias utilizam derivados de algas marinhas para formulação dos mais diversos produtos. Alguns desses derivados mais importantes são os ficocolóides: polissacarídeos de alta massa molecular compostos de polímeros de açúcar. Segundo Smith (2004), esses polissacarídeos possuem atividade antioxidante, antiviral, antitumoral e anticoagulante e os principais tipos de ficocolóides produzidos pelas algas marinhas são alginato, ágar e carragenana, conhecidas como galactanas sulfatadas.

Estima-se que, das mais de 4.000 espécies de algas vermelhas descritas até o momento, cerca de apenas 70-80 espécies são usadas para a produção industrial de galactanas (TRUUS *et al.*, 2006).

O alginato, um ficocolóide encontrado na parede celular e no espaço entre as células das algas pardas, é um polissacarídeo com caráter ácido, formado por D-manurônico e L-gulurônico, e desempenha o importante papel de retardar a dessecação da alga. O alginato extraído das algas pardas é bastante usado como espessantes nas indústrias alimentícias, têxteis, cosméticas e de papel (BOLD; WYNNE, 1985).

O ágar é um polissacarídeo bastante explorado comercialmente. Composto por resíduos de D e L-galactose, esse polissacarídeo é usado em diversos produtos alimentícios, como meio de cultura microbiológica, na formulação de cápsulas de vitaminas e drogas e base para cosméticos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Carragenanas são hidrocolóides semelhantes ao ágar, bastante usados como agente estabilizante e emulsificante em tintas, cosméticos e laticínios (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Na década 1990, estimava-se que o Brasil importava

cerca de 200 toneladas de carragenanas por ano, uma vez que a produção comercial de carragenanas no país é esporádica e pequena. Até então, apenas a espécie *Hypnea musciformis* era explorada como fonte de carragenanas. Porém, outras espécies das famílias Gigartinaceae, Hypneaceae, Phyllophloraceae e Solieriaceae passaram a ser estudadas como carragenófitas em potencial (SAITO; OLIVEIRA, 1990).

1.2. Algas Vermelhas

As algas vermelhas formam um grupo de organismos extremamente diversificado. Com cerca de 6.000 espécies, as rodófitas são diferenciadas dos outros grupos de algas pela combinação de algumas características (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Uma característica exclusiva das rodófitas é a síntese do amido das florídeas como polissacarídeo de reserva. Assim como o amido produzido pelos vegetais, o amido das florídeas é constituído por α -D-glucose, com ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ e pontos de ramificação no carbono-6 similar a amilopectina (PAINTER, 1983), porém possui uma proporção maior de ramificações assemelhando-se ao glicogênio animal. O amido das florídeas encontra-se estocado no citoplasma e nunca nos cloroplastos. O pigmento fotossintetizante acessório das algas vermelhas é chamado ficobilina, e ocorrem exclusivamente em rodófitas. Basicamente, há dois tipos de ficobilinas: as ficoeritrinas e as ficocianinas. A ficoeritrina é o pigmento acessório predominante e responsável pela coloração das rodofitas, uma vez que ele mascara completamente a presença de clorofila *a* (BOLD; WYNNE, 1985).

A parede celular das rodofitas, assim como das feófitas e clorófitas, tem como componente principal a celulose (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Algas dos gêneros *bangia* e *porphyra* apresentam xilanas e mananas como componentes principais e secundários, respectivamente, da parede celular dos macrotalos. A celulose da parede celular das rodófitas encontra-se embebida por um material amorfo e mucilaginoso, responsável pela flexibilidade, resistência e textura das algas. Os principais componentes mucilaginosos das algas vermelhas são o ágar, a carragenana e o alginato (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Entre os três grupos de macroalgas, a presença de pelo menos um tipo de polissacarídeo contendo éster sulfato é uma característica marcante, uma vez que polissacarídeos sulfatados ainda não foram relatados em plantas, embora ocorram amplamente em tecidos conjuntivos de vertebrados e em menor proporção em invertebrados (FARIAS *et al*, 2000)

Além dos polissacarídeos, outros carboidratos desempenham importantes papéis no metabolismo das rodófitas: os carboidratos de baixa massa molecular como os heterosídeos, a sacarose e os polióis. Os heterosídeos são formados por unidades de galactose ligadas ao glicerol, e tem como principais representantes nas rodófitas o floridosídeo, isofloridosídeo e digenosídeo. Os polióis são moléculas formadas por monossacarídeos altamente reduzidos, produzindo poliálcoois como manitol, sorbitol e dulcitol a partir de D-manose, D-glucose e D-galactose, respectivamente. Os carboidratos de baixa massa molecular desempenham importante função osmoregulatória (KARSTEN *et al*, 1999)

1.3. Galactanas Sulfatadas de Rhodophytas

A matriz extracelular das rodófitas é marcada pela presença de grande variedade de galactanas sulfatadas. As galactanas consistem de polímeros de galactose, mais especificamente, por cadeias lineares de dissacarídeos repetitivos. Cada dissacarídeo é constituído por duas subunidades, A e B, e o polissacarídeo é formado pela alternância dessas unidades $(AB)_n$ (FIGURA 2). A unidade A é representada pela β -D-galactopiranosose ligadas através dos carbonos C-1 e C-3 enquanto a subunidade B é representada pela α -galactopiranosose ligadas através dos carbonos C-1 e C-4. Algumas unidades B podem ocorrer na forma ciclizada entre os carbonos C-3 e C-6, formando o composto 3,6-anidro- α -L-galactose (PAINTER, 1983).

Segundo Ress (1961 *apud* USOV, 1998) o resíduo de α -L-galactose 6-sulfato é o precursor biológico do resíduo de 3,6-anidrogalactose- α -L-galactose. Há duas formas de promover essa conversão. A primeira, natural, a reação é catalisada nos tecidos algais

por uma enzima específica chamada sulfato eliminase. Uma segunda forma pode ser realizada quimicamente por tratamento alcalino dos polissacarídeos.

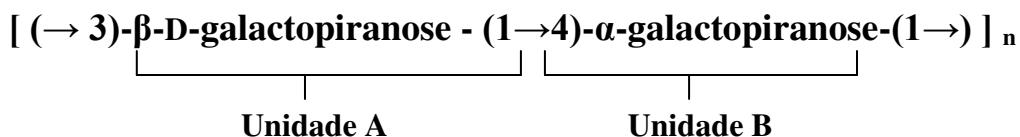


FIGURA 2: Representação esquemática estrutural das galactanas de algas vermelhas

As galactanas de algas marinhas se dividem em dois grupos: as agaranas e as carragenanas. A distinção desses grupos considera a forma enantiomérica do resíduo de galactose que compõe a unidade B, uma vez que a galactose da unidade A sempre ocorre da forma D. Se o resíduo de galactose da unidade B ocorrer na forma enantiomérica L considera-se a galactana do tipo agarana. Por outro lado, se o resíduo de galactose da unidade B apresenta-se na forma D, considera-se uma galactana do tipo carragenana. Uma característica bastante comum nas galactanas de rodófitas é a possibilidade de substituição dos grupos hidroxila por ésteres de sulfato, grupos metil, grupos acetal de ácido pirúvico e em alguns casos, por monossacarídeos adicionais. (PAINTER, 1983; FALSHAL; FURNEAUX; STEVENSON, 2005; USOV, 1998; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998; MARINHO-SORIANO, 2001). Esses grupos substituintes ocorrem nas agaranas e carragenanas de forma bem peculiar: geralmente as carragenanas têm maior conteúdo de sulfato que as agaranas. Por outro lado, as agaranas apresentam maior grau de substituição por grupos metil e piruvatos que as carragenanas (LAHAYE, 2001).

Knutsen *et al.* (1994) propuseram uma forma de codificar as unidades galactosídicas e seus respectivos grupos substituintes, considerando as diferenças entre agaranas e carragenanas. Segundo suas propostas, as letras D e L codificariam as unidades B (4-*O*-ligadas) das galactanas, D-galactose e L-galactose, respectivamente, enquanto DA e LA codificariam D-anidrogalactose e L-anidrogalactose. Os números representam os carbonos onde ocorrem as substituições (TABELA 2).

TABELA 2: Codificação dos resíduos de açúcar e grupos substituintes presentes nas galactanas (KNUTSEN *et al*, 1994). Números correspondem o átomo de carbono no qual o substituinte encontra-se ligado

Código	Unidade monossacarídica correspondente
D	(1→4)- α -D-galactopiranosil
DA	(1→4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosil
G	3-ligado - β -D-galactopiranosil
L	(1→4)- α -L-galactopiranosil
LA	(1→4)-3,6-anidro- α -L-galactopiranosil
M	<i>O</i> -metil
P	4,6- <i>O</i> -(1-carboxietilideno)
S	Ester Sulfato
L2M,6S	(1→4)-2- <i>O</i> -metil- α -L-galactopiranosil-6-sulfato
G4S-DA-G	→3)- β -D-galactopiranosil 4-sulfato (1→4) 3,6-anidro- α -D-galactopiranosil (1→3) β -D-galactopiranosil (1→

A caracterização química das galactanas de algas vermelhas, bem como o número e os tipos de substituintes, é um passo essencial para o estudo das propriedades e aplicações desses polímeros. Métodos químicos e espectroscópicos são as principais ferramentas para a caracterização de galactanas de rodófitas (FALSHAW; FURNEAUX, 1994; USOV, 1998)

1.3.1. Agaranas

O ágar é a mistura de polissacarídeos encontrados na matriz celular das algas vermelhas (Rhodophyta), especialmente os membros das famílias Gelidiaceae e Gracilariaceae (ARMISEN; GALACTAS, 1987 apud MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). O ágar consiste em dois diferentes componentes: agarose e agaropectina. A agarose é um polissacarídeo neutro, caracterizado por uma estrutura linear de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose D-galactose e 3,6-L-galactose. Já a agaropectina caracteriza-se como um polisacarídeo ácido contendo éster sulfato, ácido pirúvico e ácido D-gucurônico adicionado à agarobiose (ARAKI, 1966 apud MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005).

Knutsen *et al* (1994) propuseram que o termo “agarana” deveria ser empregado para designar polissacarídeos constituídos por monômeros de dissacarídeos repetitivos de ($\rightarrow 3$)- β -D-galactose ligada a ($1\rightarrow 4$)- α -L-galactose (FIGURA 3).

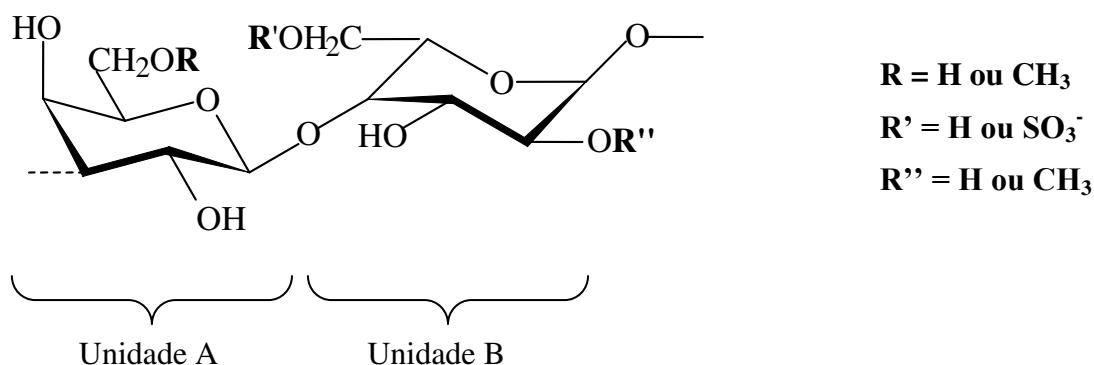


FIGURA 3: Padrão estrutural do dissacarídeo presente nas agaranas.

Por outro lado, o termo “agarose” designaria o polissacarídeo semelhante às agaranas, porém, sua unidade B (4-O-ligada) ocorreria na forma de 3,6-anidro- α -L-galactose, ou simplesmente 3,6-anidrogalactose (FIGURA 4a). Segundo Nosedá e Cerezo (1995) a agarose teria como precursor biológico natural o composto α -L-

galactose-6-sulfato. (FIGURA 4b). A agarose é a galactana com maior propriedade gelificante devido à presença da ligação anídrica entre os carbonos C-3 e C-6 da unidade B das galactanas. (KNUTSEN *et al*, 1994).

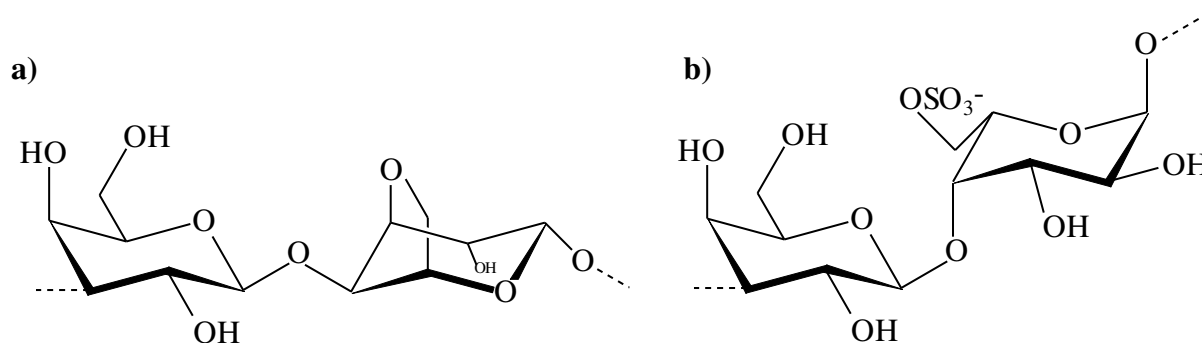


FIGURA 4: Padrão estrutural da agarose (a) e de seu precursor biológico natural (b)

Geralmente, espécies do gênero *Gracilaria* produzem ágar com baixa qualidade devido ao alto conteúdo de sulfato (MARINHO-SORIANO, 2001). No entanto, a qualidade do ágar pode ser aumentada através do tratamento de hidrólise alcalina, com conversão de L-galactose-6-sulfato para 3,6-anidro-L-galactose (ARMISEN; GALACTAS, 1987)

1.3.2. Carragenanas

Carragenana é um nome genérico para uma família de polisacarídeos sulfatados, com cadeia linear, e solúveis em água, obtidos por extração de certas espécies de algas vermelhas, e que são muito explorados comercialmente devido suas propriedades gelificantes e estabilizantes (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*,2002). Esse grupo de galactanas é formado por unidades repetitivas de dímeros contendo β-D-galactose ligada a (1→4)-α-D-galactose. (FALSHAW, FURNEAUX; STEVENSON, 2005; USOV, 1998; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998 MARINHIO-SORIANO, 2001; DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*,2002).

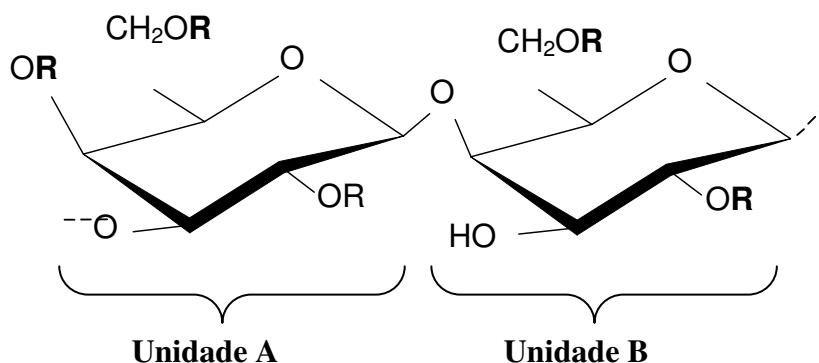


FIGURA 5: Padrão estrutural do dissacarídeo presente nas carragenanas

Tradicionalmente, as carragenanas são classificadas por letras gregas, que indicavam o maior componente de uma amostra. Essa identificação é bastante utilizada na ciência, legislação e regulação, porém, apresenta problemas no ponto de vista científico, pois se trata de uma nomenclatura não lógica, inflexível, e incapaz de descrever, sem ambigüidade, polímeros complexos (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Tendo em vista esse problema, uma nova nomenclatura foi proposta por Knutsen *et al* (1994), e atribuía letras-código para identificar cada monômero que compunha a galactana. Essa nomenclatura baseada em letras-código, apresentada na tabela 5, é atualmente adotada pela “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), e proporciona uma classificação sistemática para polímeros complexos (VAN DE VELDE *et al.*, 2002.)

TABELA 3: Nomenclatura alternativa para as carragenanas proposta por Knutsen *et al* (1994), modificada por Cauduro *et al.* (2000)

Unidade A (1→3)	Unidade B (1→4)	Carragenana	Família
G4S	DA	κ (kappa)	Kappa
G4S	DA2S	ι (iota)	
G4S	D6S	μ (mu)	
G4S	D2S,6S	ν (nu)	
G4S	D2S	ο (omicron)	
G	DA	β (beta)	Beta
G	D6S	γ (gamma)	
G	D2S,6S	δ (delta)	
G	DA2S	α (alpha)	
G2S	D2S,6S	λ (lambda)	Lambda
G2S	DA2S	θ (theta)	
G2S	D2S	ξ (xi)	
GP,2S	D2S	π (pi)	Omega
G6S	DA	ω (omega)	
G6S	D6S	ψ (psi)	

Geralmente, as carragenanas naturais são misturas de diferentes polissacarídeos sulfatados. Diferentes tipos de híbridos de carragenanas são bastante relatados como κ / ι- híbrido , κ / β- híbrido, ξ / θ- híbrido, ν / ι- híbrido, e mais estruturas complexas contendo unidades metiladas e piruvatadas (VAN DEN VELDE, 2008). As misturas e proporções de carragenana podem variar de acordo com espécies, estágio de vida, condições fisiológicas e ambientais. A fase gametofítica de *Gigartina pistillata* produz carragenana híbrida do tipo kappa/iota, com pouca quantidade de nu-carragenana. Já o tetrasporófito da alga produz uma mistura de lambda/xi/pi-carragenana (AMIMI *et al*, 2001).

Segundo Falshaw e Furneaux (1995), *Gigartina clavifera* e *Gigartina alveota* produzem carragenanas híbridas do tipo λ e ξ. A alga vermelha *Callophyllis hombroniana* sintetiza basicamente θ- e λ- carragenana (FALSHAW; FURNEAUX; STEVENSON, 2005).

O conteúdo de $-O-SO_3^-$ nos polissacarídeos sulfatados pode variar entre 0-41%(m/m), podendo resultar em polímeros altamente carregados negativamente. Carragenanas comerciais, como a κ , ι e λ contém 22, 32 e 38% (m/m) de sulfato, respectivamente, e massa molecular entre 400 e 600 kDa. A determinação do conteúdo de sulfato, bem como as posições desses grupos, é importante para o estudo das propriedades reológicas dos polímeros, suas aplicações em alimentos e cosméticos e suas possíveis aplicações médicas (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

As carragenanas do tipo κ e ι têm a propriedade de formar gel devido à presença de um resíduo de 3,6-anidrogalactose na unidade B do dissacarídeo enquanto a λ -carragenana, caracteriza-se pela alta viscosidade, e pela incapacidade de formar gel (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

1.3.3. Híbrido D/L

Alem dos principais tipos de galactanas (agaranas e carragenanas), um terceiro tipo foi identificado. Trata-se de um grupo de galactanas que apresentam características tanto de agaranas quanto de carragenanas. Inicialmente, esse novo grupo foi chamado de carrágar (CHOPIN; KERIN; MAZEROLLE, 1999), mas, posteriormente, Stortz e Cerezo (2000) propuseram o nome galactana DL-híbrida. A principal característica das galactanas DL-híbridas está na unidade B da estrutura regular das galactanas, que pode ocorrer tanto na forma D quanto na forma L. Dessa forma, a determinação das unidades enantioméricas é o ponto fundamental para a caracterização dessas galactanas.

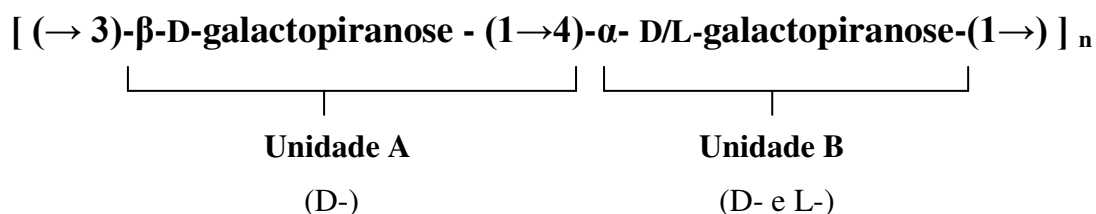


FIGURA 6: Representação esquemática estrutural das galactanas DL-híbridas de algas vermelhas

As galactanas DL-híbridas são definidas de acordo com a proporção da configuração presente na unidade B das galactanas. Se a unidade B apresenta maior quantidade da configuração D-, denomina-se DL-híbrida com predomínio de estrutura de carragenana. Por outro lado, se a unidade B apresentar maior quantidade da configuração L, denomina-se DL-híbrida com predomínio de estrutura de agarana. (STORTZ; CERREZO, 2000 *apud* FARIA-TISCHER, 2006).

A recente descoberta das galactanas do DL-híbridas proporcionou o estudo mais minucioso das algas consideradas anteriormente como agarófitas ou carragenóficas exclusivas. Apesar de o gênero *Gymnogongrus* ser considerado como carragenófito, Esteves, Ciancia e Cerezo (2004) encontraram uma galactana DL-híbrida, com maiores quantidades de agaranas e carragenanas típicas e menores quantidades de agaranas com padrão não usual. A alga *Kappaphycus alvarezii* apresentou uma galactana DL-híbrida constituída de agaranas e agarana- κ -carragenana, e marcante presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Os cátions divalentes atuam como agente agregante entre galactanas híbridas (ESTEVEZ; CIANCIA; CERREZO, 2004).

1.4. Considerações Teóricas Sobre Viscosidade dos Fluidos

O coeficiente de viscosidade, ou simplesmente viscosidade, é uma grandeza física muito utilizada como parte da caracterização de uma solução, e descreve a resistência de um fluido ao escoamento. Tanto substâncias líquidas quanto gasosas são consideradas como fluidos, sendo que essas últimas são chamadas, especificamente, de fluidos elásticos. Todos os fluidos apresentam a propriedade de oferecer resistência à mudança de forma em resposta a uma força. Dessa forma, a viscosidade é função da natureza do fluido, da temperatura, da pressão e da taxa de deformação angular (VIEIRA, 1971).

A unidade de viscosidade é o *poise*, definida como a força de cisalhamento requerida para produzir uma velocidade de 1 cm s^{-1} entre dois planos moleculares paralelos, de 1 cm^2 de área separados por uma distância de 1 cm (VIEIRA, 1971).

Os materiais são divididos em duas categorias gerais, dependendo de suas características de fluxo: Newtonianos e não-Newtonianos. O fluxo Newtoniano caracteriza-se por viscosidade constante, independente da velocidade de cisalhamento aplicada, enquanto o não-Newtoniano por uma mudança na viscosidade com o aumento na velocidade de cisalhamento.

O coeficiente de viscosidade pode ser determinado através da velocidade de escoamento do fluido por um tubo capilar. Uma metodologia bastante comum na determinação da viscosidade de fluidos emprega o viscosímetro de Ostwald, que permite a determinação da viscosidade relativa de um fluido a partir de uma substância padrão. Dessa forma, a medida do coeficiente de viscosidade de uma substância desconhecida é feita pela comparação com o tempo de vazão de um fluido de viscosidade conhecida, geralmente a água, através de um capilar. A viscosidade relativa é uma grandeza adimensional, pois se refere à razão entre dois valores de mesma grandeza física (TONELI; MURR; PARK, 2005). A viscosidade específica e a viscosidade reduzida são parâmetros obtidos a partir da viscosidade relativa, como demonstrado nas equações abaixo:

$$\text{Viscosidade Relativa: } \eta_{\text{rel}} = \eta / \eta_s$$

$$\text{Viscosidade Específica: } \eta_{\text{esp}} = (\eta - \eta_s) / \eta_s$$

$$\text{Viscosidade Reduzida: } [\eta] = \eta_{\text{esp}} / C$$

Onde η é a viscosidade da solução, η_s é a viscosidade do solvente e C é a concentração da substância analisada.

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é determinada a partir da equação do gráfico da viscosidade reduzida versus concentração de polissacarídeo, através da extrapolação da equação da reta ($y = ax + b$) para a concentração zero ($x = 0$)

O estudo da viscosidade de biopolímeros é um fator importantíssimo para diversos ramos da indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, de tintas e agroindústria. A principal característica que explica a grande utilização de polissacarídeos nas indústrias é a capacidade de alteração de suas propriedades físicas quando em solução, resultando em fluidos de alta viscosidade (MORRIS, 1995).

A viscosidade dos fluidos leva em consideração, acima de tudo, as interações entre as moléculas em solução. Numa solução diluída de polissacarídeos, os polímeros encontram-se na forma de espirais desordenadas e aleatórias. Soluções de polissacarídeos com concentrações mais elevadas indicam aumento no número de espirais que, conseqüentemente, proporcionam a interação entre os espirais resultando na sobreposição e acomodação de uma espiral sobre outra. A quantidade das interações inter-espirais promove aumento na resistência dos fluidos à força, ou seja, aumento da viscosidade (TONELI; MURR; PARK, 2005).

1.5. Considerações Teóricas sobre Toxicidade

A toxicologia é a ciência que estuda as manifestações (clínica e/ou laboratoriais) de efeitos adversos causados em resposta à interação de um agente tóxico com um organismo. Entende-se como agente tóxico uma substância química que perturba o equilíbrio homeostático de um organismo.

A toxicidade depende de vários fatores, relativos à molécula tóxica ou ao organismo vítima da intoxicação. As propriedades químicas do agente tóxico, como a solubilidade, influenciam diretamente nas respostas do organismo, pois em geral, moléculas lipossolúveis têm maior facilidade de atravessar as membranas. O grau de ionização do agente tóxico também é um fator que influencia no processo toxicológico, uma vez que as membranas biológicas são mais permeáveis à moléculas ionizadas.

Entre os fatores toxicológicos intrínsecos ao organismo vítima da intoxicação, podemos citar a forma como o agente tóxico foi administrado, a biodisponibilidade do agente no organismo, a metabolização, biotransformação e os mecanismos de eliminação do agente tóxico.

A análise toxicológica visa à coleta de dados de um organismo em resposta a um agente tóxico. Geralmente, esses dados são obtidos através de experimentação animal em laboratório, ou pelo registro de manifestações ocorridas em populações livres. Por

fim, a avaliação toxicológica de uma substância tem com objetivo classificá-la quanto ao risco, bem como fornecer informação quanto ao seu uso seguro.

Alguns modelos são usados para determinar a toxicidade em animais. Cada modelo é formado por um conjunto de variáveis que são determinantes para a obtenção dos resultados durante os experimentos: variáveis quanto aos animais (espécie, linhagem, idade e sexo); variáveis quanto à substância (via de administração e velocidade da administração) e por último, variáveis quanto às instalações e fatores periódicos (umidade relativa do ar, temperatura, tipo de gaiola, condições de higiene, adaptação dos animais ao ciclo dia-noite).

A avaliação da toxicidade aguda tem como objetivo principal avaliar os sinais promovidos pela intoxicação em curto prazo. Geralmente, os animais são submetidos à doses diferentes durante curtos períodos de tempo. Por outro lado, a avaliação da toxicidade crônica busca informações sobre efeito cumulativo de uma substância tóxica em um determinado grupo de animais, durante um tempo prolongado.

A obtenção, e acima de tudo, a quantificação dos indícios de toxicidade são cruciais para a análise toxicológica de certa substância. Muitos desses indícios são obtidos no plasma sanguíneo dos animais em experimentação. Alterações no metabolismo de biomoléculas como glicose, colesterol, proteínas (AST e ALT) podem está ligadas à toxicidade hepática ou de outros órgãos. O acompanhamento das alterações no peso dos animais em experimentação também pode revelar sinais de toxicidade. Outros indícios de toxicidade são obtidos através da análise dos órgãos de animais submetidos á agentes tóxicos. Alterações nos padrões estruturais dos órgãos como: hipertrofia, atrofia, descamação, edema, hemorragia e infiltração de células macrofágicas são alguns dos sinais de toxicidade observados através de exames histológicos.

As algas marinhas são tradicionalmente consumidas nos países orientais e, em menor escala em outras regiões do mundo. Ricas em polissacarídeos, minerais e vitaminas, as algas marinhas vêm-se apresentando como uma alternativa ou complemento à dieta vegetariana em diversos países do ocidente. Entretanto, apesar das vantagens, as propriedades tóxicas e antinutricionais das algas marinhas ainda não foram bem estudadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Esse trabalho tem como objetivo principal avaliar a estrutura química e o potencial toxicológico dos polissacarídeos da rodófito *Gracilaria birdiae* visando possíveis aplicações biológicas, biotecnológicas ou industriais.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver estratégias de extração de polissacarídeos de *G. birdiae*;
- Determinar a massa molar dos polissacarídeos através de Cromatografia em Permeação em Gel (GPC);
- Determinar a estrutura química fina dos polissacarídeos de *G. birdiae* através de métodos químicos e espectroscópicos;
- Avaliar a viscosidade relativa da solução de polissacarídeo de *G. birdiae*
- Avaliar a toxicidade aguda em camundongos por via intraperitoneal
- Avaliar a toxicidade sub-crônica dos polissacarídeos de *G. birdiae* em ratos pela via oral, através de parâmetros bioquímicos e histopatológicos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Álcool etílico comercial e acetona (P.A.) foram obtidos comercialmente, sulfato de sódio, gelatina-bário, albumina sérica bovina, ácido tricloroacético (TCA) de Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA. Etanol P.A., formol, xilol, hematoxilina, eosina, éter etílico.

3.2. Algas Marinhas

Os exemplares da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, oriundas de cultivo, foram coletados na praia de Flecheiras (3°22'S, 39°25'W), município de Trairí, Ceará. Após a coleta, as algas foram transportadas em recipientes térmicos em baixas temperaturas para o Laboratório de Algas Marinhas da Universidade Federal do Ceará. Posteriormente, as algas foram lavadas com água corrente e separadas de epífitas e de outras algas. Por último, as algas foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados e armazenados a temperatura de -20° C, até posterior utilização.

3.3. Animais

Os ensaios de toxicidade do polissacarídeo de *G. birdiae* foram realizados com camundongos (*Mus musculus*) e ratos albinos (*Ratus norvegicus*) linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram transportados para o Laboratório de Experimentação Animal da Universidade de Fortaleza, aclimatados em caixas de plástico sob condições adequadas em regime

alimentar próprio de laboratório, com água *ad libitum*, regime de 12 horas claro / escuro, temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$) e umidade ($30\% \pm 5$).

3.4. Mecanismo de Extração dos Polissacarídeos de *G. birdiae*

O mecanismo de extração dos polissacarídeos de *G. birdiae* está apresentado na figura 7. A alga marinha úmida passou por um processo de secagem à temperatura ambiente seguido de maceração em nitrogênio líquido. Depois de triturada, uma amostra de 5 g da alga marinha foi submetida à extração aquosa (1,5 % m/v) a temperatura ambiente por 15 h sob agitação. Posteriormente o extrato foi filtrado em malha fina. O sobrenadante resultante do filtrado foi concentrado por evaporação rotativa e precipitado com etanol (3 volumes). Por último, o carboidrato foi filtrado em funil de placa sinterizada (nº 2) e seco em acetona P.A. A alga triturada foi submetida à um segundo processo de extração, dessa vez à temperatura de 100°C por 45 minutos seguido de filtração em malha fina. Nessa segunda extração, o resíduo foi descartado e o filtrado passou pelos processos de concentração em evaporador rotativo, precipitação com etanol (3 volumes), filtração em funil de placa sinterizada (nº 2) e por último, secagem e acetona P.A.

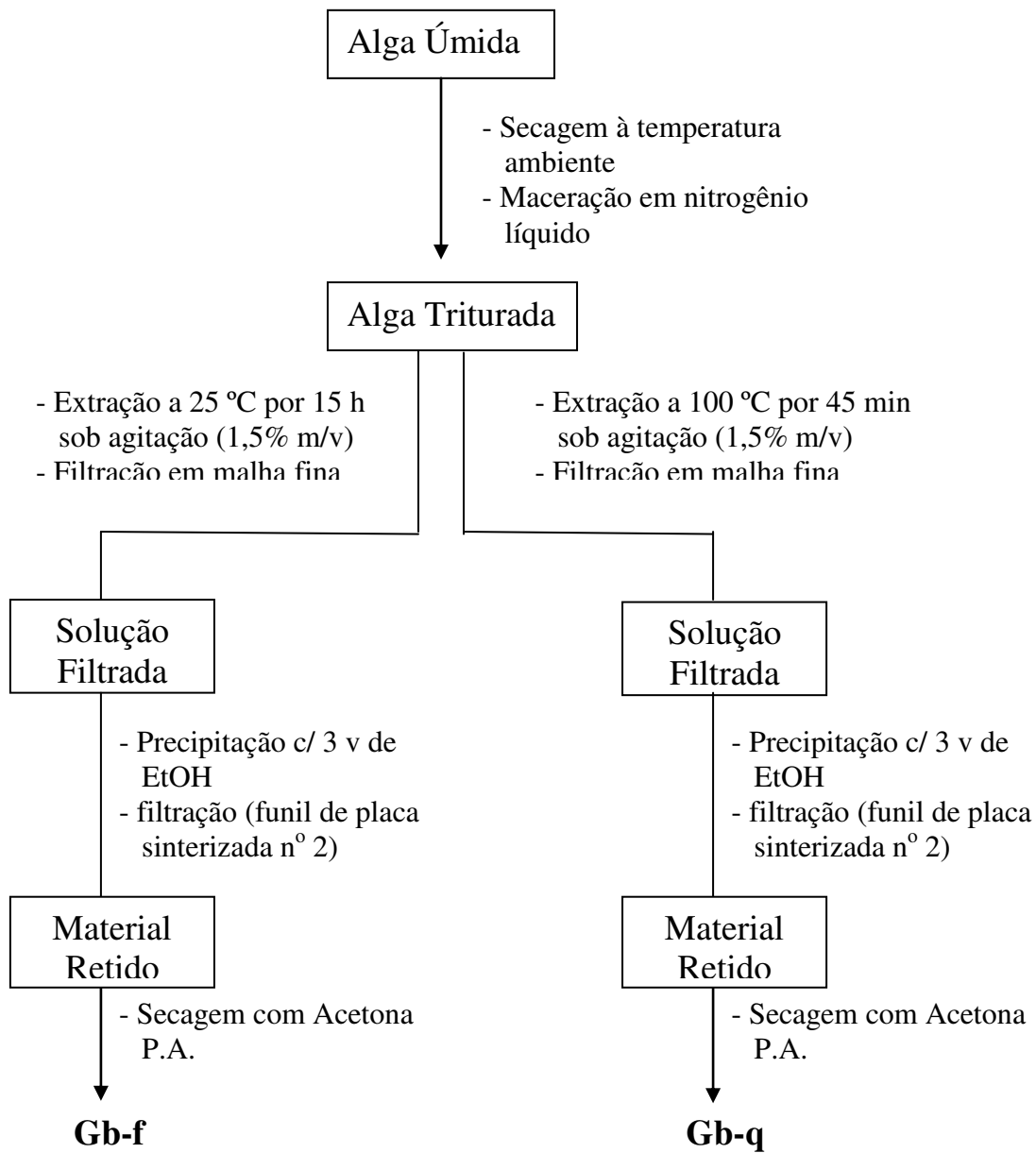


Figura 7: Fluxograma de extração dos polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria birdiae*

3.5. Determinação do Rendimento da Extração de *G. birdiae*

O rendimento da extração foi calculado à partir de 5 g da alga seca triturada em nitrogênio líquido. Após a extração e secagem e secagem dos polissacarídeos, dosagens de carboidratos, proteínas e sulfato foram estimadas a partir de uma solução de 2 mg/mL e, posteriormente, foi calculado o rendimento da extração.

3.5.1. Dosagem de Carboidratos

A técnica descrita por Dubois *et al.* (1956) foi empregada para determinação de carboidratos. As absorvâncias foram lidas a 490 nm em espectrofotômetro Genesys – Spectronic 20. A concentração de carboidratos solúveis foi estimada com relação a uma curva usando como padrão galactose.

3.5.2. Dosagem de Proteínas

A quantificação de proteínas nas amostras de polissacarídeos foi calculada por microanálise elementar à partir da porcentagem de nitrogênio (%N) usando um fator de correção de 6,25, proposto por Marks, Baum e Swain (1985).

3.5.3. Dosagem de Sulfato

As dosagens de sulfato nos polissacarídeos de *G. birdiae* extraídos à temperatura ambiente e a 100° C foram determinadas por microanálise elementar (Perkin Elmer CHN 2400), proposto por Marks, Baum e Swain (1985)

3.6. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A distribuição das massas molares dos polissacarídeos de *G. birdiae* foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC), em equipamento Shimadzu com detectores de índice de refração e UV-visível a 254 nm, à temperatura ambiente com coluna de Ultrahydrogel (7.8 x 300 mm) e fluxo de 0.5 mL/min. Esse ensaio foi realizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará.

Para esse ensaio foi usado uma solução de polissacarídeo de *G. birdiae* 0.5 % e NaNO₃ 0,1 M como solvente. O volume injetado das amostras e dos padrões foi de 50 µL. Amostras de pululanas (Shodex Denko) de diferentes massas molares (5.9 x 10³, 1,18 x 10⁴, 4.73 x 10⁴, 2.12 x 10⁵ e 7.8 x 10⁵ g/mol) foram usadas como padrão para a determinação das massas molares.

3.7. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Espectros na região do infravermelho das amostras dos polissacarídeos de *G. birdiae* foram produzidos com espectrofotômetro Shimadzu IR (modelo 8300) na região de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹, em pastilhas de KBr.

3.8. Ressonância Magnética Nuclear

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) ¹³C e ¹H mono e bidimensionais foram feitas no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará em espectroscópio da marca Bruker, modelo AVANCE – DRX – 500.

Para a obtenção dos espectros de RMN, uma amostra do polissacarídeo foi dissolvida em água deuterada (D²O - ~30 mg/mL⁻¹) em tubos de diâmetro externo de 5

mm. O ensaio foi realizado a 70° C por 12 horas usando Sodium 2,2 - dimethylsilapentane - 5 - Sulfonate (DSS) como padrão interno (0.00 ppm para ¹H)

3.9. Ensaio da Viscosidade (Viscosidade Relativa)

O ensaio de viscosidade relativa foi realizado em viscosímetro capilar do tipo Ostwald ref. 75, em banho termostático, marca Quimis, à temperatura controlada de 26° C. Uma solução de carboidrato da alga *G. birdiae* foi preparada em água destilada na concentração de 2,0 mg/mL, a 25° C sob agitação por 12 h. Soluções diluídas foram preparadas nas concentrações 1,5; 1,0; 0,75; 0,5 e 0,25 mg/mL. Água destilada foi utilizada como fluido padrão para a determinação da viscosidade relativa do polissacarídeo.

3.10. Avaliação Toxicológica

3.10.1. Toxicidade Aguda

O estudo da toxicidade aguda do polissacarídeo de *G. birdiae* buscou avaliar o potencial risco de intoxicação em animais, quando submetidos à altas doses do carboidrato durante um período curto de tempo.

Essa análise foi realizada com camundongos (*Mus musculus*) fêmeas adultas hípidas, nulíparas e não grávidas. Foram administradas três doses de carboidratos (0,5; 1,0 e 2,5 mg/100g de animal), via intraperitoneal. Cada grupo era composto por dois animais, que foram observados durante 24, 36 e 48h quanto às alterações no pêlo, pele, mucosas, olhos e manifestações comportamentais em geral. No final desse período, os animais foram pesados.

3.10.2. Toxicidade Subcrônica

A avaliação do potencial tóxico subcrônico do polissacarídeo de *G. birdiae* tem como finalidade estudar os indícios de toxicidade em animais, quando estes são submetidos à administração contínua e prolongada do carboidrato.

O experimento de toxicidade subcrônica empregou 20 ratos (*Ratus norvegicus*) jovens, hípidos, fêmeas nulíparas e não grávidas, 10 machos e 10 fêmeas, sendo que 5 machos e 5 fêmeas compunham os grupos controles. Os animais do grupo teste foram submetidos à dose de polissacarídeo de 50mg / 100g de animal. O carboidrato foi dissolvido em soro fisiológico e administrado via oral por sonda gástrica durante 90 dias. Os animais do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém, foi administrado somente soro fisiológico. As massas dos ratos foram acompanhadas semanalmente e as dosagens de polissacarídeos recalculadas conforme ganho ou perda de peso.

Durante o período de experimentação, alterações no pêlo, pele, mucosas, olhos e manifestações comportamentais em geral foram observados. Ao final das 90 dias, alíquotas do sangue dos animais foram coletadas por punção retro orbital e centrifugadas em centrífuga de bancada para a separação do plasma sangüíneo. A contagem de leucócitos totais foi realizada com 20 µL de sangue adicionados a 300 µL do reagente de Turck, seguido de homogeneização e contagem de células em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Posteriormente, com o plasma sangüíneo, dosagens de glicose, colesterol, proteína, creatinina, e as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram realizadas através de kits diagnósticos Labtest®, segundo metodologias descritas pelo próprio fabricante.

Por último, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus órgãos retirados e imediatamente armazenados em formaldeído 10% para posterior avaliação histopatológica, com cortes histológicos em micrótomo na espessura de 5 µm, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados em microscópio óptico.

O acompanhamento da massa e análises bioquímicas do plasma sanguíneo dos animais entre os grupos controle e teste foram comparadas e submetidas ao teste *t* de student.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração, Rendimento e Análises Químicas dos Polissacarídeos de *G. birdiae*

A extração dos polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria birdiae* consistiu em duas fases: a primeira, a temperatura ambiente, produziu uma fração denominada (Gb-f). Já a segunda extração, ocorrida à temperatura de 100 °C, produziu uma fração denominada Gb-q. A análise das duas metodologias tem como objetivo promover a comparação entre elas quanto ao rendimento e quantificação dos principais componentes bioquímicos, e ainda fornecer subsídios que auxiliem na caracterização das frações extraídas.

Os rendimentos das extrações foram calculados a partir de 5 g de alga seca, e macerados em nitrogênio líquido. A massa obtida de cada extração, o rendimento e a quantificação de carboidratos totais, proteínas, sulfato e o grau de sulfatação (DS) estão apresentados na tabela abaixo.

TABELA 4: Rendimento e análises bioquímicas dos polissacarídeos de *Gracilaria birdiae* extraída a 25 e 100° C

Fração	Rendimento ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c NaSO ₃ (%)	Grau de Sulfatação	Proteína ^d (%)
Gb-f	6,4	62	6,4	0,22	7,6
Gb-q	56	91,2	1,36	0,04	2,0

a: Rendimento expresso à partir de 5g de alga seca e triturada

b: Determinados pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS, *et al.*, 1956)

c, d: Determinado por microanálise elementar

A extração à temperatura ambiente apresentou massa final de 0,32g, que corresponde ao rendimento de 6,4% da massa seca inicial, muito abaixo do rendimento encontrado por Melo *et al.* (2002) para *G. cornea* do Brasil, (21,4%) (Tabela 5). O baixo rendimento deve-se à baixa temperatura da extração, mas, comparado aos mínimos de rendimentos encontrados em *G. cervicornis* (MARINHO-SORIANO, 2001) e *G. gracilis* (MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998), 11 e 11,1% respectivamente, a extração à temperatura ambiente de *G. birdiae* apresentou rendimento considerável, uma vez que as duas primeiras foram extraídas a altas temperaturas.

A massa de polissacarídeo obtida da extração a 100 °C foi de 2,8% da massa seca inicial da alga e apresentou rendimento de 56%. Esse resultado está acima da média de rendimento encontrada em algas do gênero *Gracilaria* (TABELA 5). O alto rendimento dessa extração pode ser atribuído à adição de NaCl (1:1 m/m) ao extrato aquoso dos polissacarídeos antes da precipitação com etanol.

TABELA 5: Rendimento de ágar de algumas espécies de *Gracilaria*

Espécie	Rendim.(%)	Localidade	Fonte
<i>G. dura</i>	32 – 35 ^a	França	Marinho-Soriano;Bourret, 2005.
<i>G. cervicornis</i>	11 – 20 ^b	Brasil (RN)	Marinho-Soriano, 2001.
<i>G. cervicornis</i>	39,3	México	Freire-Peregrin;Murano, 2005.
<i>G. corticata</i>	21,8	Madagascar	Adriamanantoanina <i>et al.</i> , 2007.
<i>G. fisheri</i>	13,3	Tailândia	Praiboon <i>et al.</i> ,2006.
<i>G. edulis</i>	10,9	Tailândia	Praiboon <i>et al.</i> ,2006.
<i>Gracilaria sp.</i>	39,4	Japão	Praiboon <i>et al.</i> ,2006.
<i>G. gracilis</i>	11,1 – 18,7 ^c	França	Mollet;Rahaoui;Lemoine, 1998.
<i>G. bursa-pastoris</i>	34,8	França	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. dura</i>	33,5	França	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. gracilis</i>	30,0	França	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. salicornia</i>	30,2%	Tanzânia	Buriyo; Kivaisi, 2003
<i>G. cornea</i>	21,4	Brasil (CE)	Melo <i>et al.</i> , 2002.
<i>G. bursa-pastoris</i>	36,5 – 38,3 ^d	França	Marinho-Soriano <i>et al.</i> , 1999.

a: Máximo mês de outubro e mínimo no mês de junho

b:Máximo e mínimo na estação seca

c: Máximo mês de março e mínimo mês de abril

d: Extração a partir do estágio vegetativo e reprodutivo da alga, respectivamente.

O conteúdo de nitrogênio nas amostras extraídas a frio foi de 1,22%, valor alto comparado com *G. birdiae* (0,41-0,47%) (MELO *et al.*, 2002), mas inferior rendimento ao obtido por Marinho-Soriano e Bourret (2005) com *G. dura* (2,91%). O polissacarídeo extraído a 100° C apresentou conteúdo de nitrogênio (0,33%), muito abaixo dos valores encontrados na literatura. Usando o fator de correlação de 6,25, obtivemos os rendimentos protéicos de 7,6 e 2,0% para Gb-f e Gb-q, respectivamente (TABELA 4).

As frações Gb-f e Gb-q apresentaram conteúdo de sulfato de 6,4 e 1,36% respectivamente. O conteúdo de sulfato comum ao gênero *Gracilaria* gira em torno de 2,3 a 13,9 %, como relatado por Craigie *et al.* (1984), Valiente *et al.* (1992), Melo *et al.* (2002). O grau de sulfatação foi determinado pela C % e S %, usando a equação (1). A equação proposta é baseada na estrutura da agarobiose (FIGURA 4a), considerando que o grau de sulfatação é definido como o número de grupos OSO₃⁻ ou átomos de sulfato por unidade de dissacarídeo, que possui 12 átomos de carbono.

$$(S \% / \text{massa atômica do S}) / (C \% / \text{massa atômica do C} \times 12) = 4,5 (S \% / C \%)$$

Eq. (1)

O grau de sulfatação para o polissacarídeo de *G. birdiae* extraído a temperatura ambiente foi de 0,22, mesmo valor encontrado para o polissacarídeo solúvel de *G. cornea* (MELO *et al.*,2002), enquanto que o extraído à 100° C apresentou o valor de 0,04.

4.2. Caracterização Química dos Polissacarídeos de *G. birdiae*

4.2.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Polissacarídeos são macromoléculas polidispersas quanto à massa molar, ou seja, não possuem massa molar nitidamente definida. Dessa forma, a massa molar dos polissacarídeos é representada pela média da massa molecular dos polímeros semelhantes na estrutura, pois variam com o tamanho da cadeia (STANLEY, 1995).

O cromatograma de GPC de *G. birdiae* extraída a temperatura ambiente está apresentado na FIGURA 8. São observados um pico principal em 7,4 mL (pico I) e um ombro em 8,4 mL (pico II) de volume de eluição, detectados pelo índice de refração. As massas molares dos picos foram estimadas a partir da equação $\log M_w = 13,03 - 0,9449 V_e$, onde V_e corresponde ao volume de eluição. O coeficiente de correlação linear para essa reta foi 0,9980. Os picos I e II obtiveram massas molares de $1,11 \times 10^6$ e $1,26 \times 10^5$, respectivamente (TABELA 6)

O perfil cromatográfico de GPC do polissacarídeo extraído a 100° C esta apresentado na FIGURA 9. Também é observado um pico principal (pico I) e um ombro (pico II), com volume de eluição de 7,6 e 8,1 mL. A equação da reta para a determinação das massas molares desses picos é $\log M_w = 12,55 - 0,9273 V_e$, com coeficiente de regressão linear de 0,9970. A partir dessa equação, a massa molar do pico I foi de $3,18 \times 10^5$ enquanto a massa molar do pico II foi de $1,09 \times 10^5$, como demonstrado na TABELA 6.

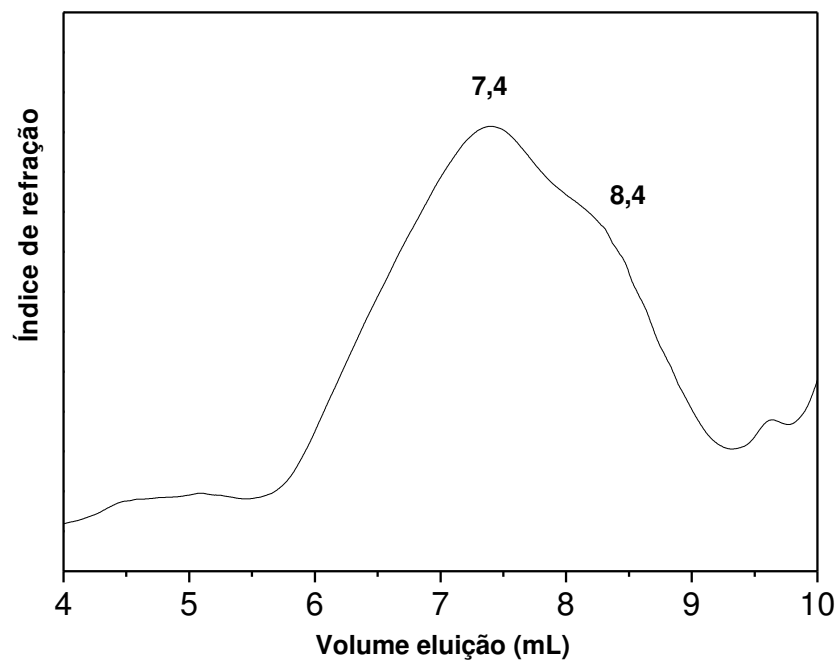


FIGURA 8: Cromatograma de GPC do polissacarídeo de *G. birdiae* extraído à temperatura ambiente

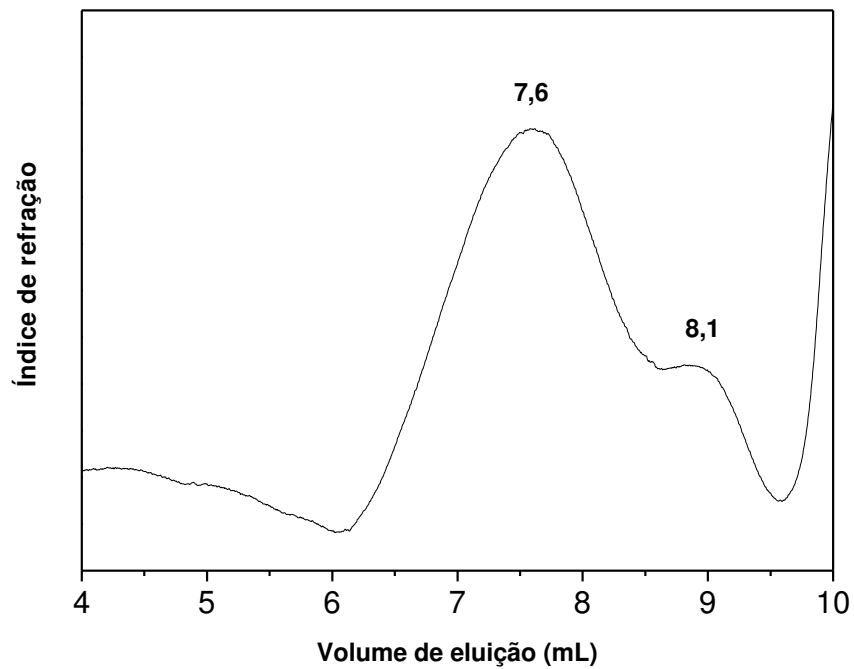


FIGURA 9: Cromatograma de GPC do polissacarídeo de *G. birdiae* extraído a 100° C

Os cromatogramas de GPC, tanto para o polissacarídeo extraído a frio quanto para o extraído a 100° C, apresentou altas massas molares, inclusive no limite máximo de exclusão da coluna (10^6). O polissacarídeo de *G. birdiae* comporta-se como um sistema polidisperso semelhante a outros polissacarídeos de algas como *G. cornea* (MELO *et al.*, 2002) e *Botryocladia occidentalis* (FARIAS *et al.*, 2000).

TABELA 6: Massas molares de cada pico das extrações de polissacarídeos de *G. birdiae* extraída à temperatura ambiente e a 100° C.

Frações	Picos	Volume de Eluição (mL)	Massa Molar (g/mol)
Gb1	I	7,4	$1,11 \times 10^6$
	II	8,4	$1,26 \times 10^5$
Gb2	I	7,6	$3,18 \times 10^5$
	II	8,1	$1,09 \times 10^5$

4.2.2. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho dos polissacarídeos extraídos à temperatura ambiente (FIGURA 10) e a 100° C (FIGURA 11) demonstram perfis espectroscópicos semelhantes. Bandas características de agarocolóides foram observadas para o polissacarídeo de *G. birdiae* ($1375, 1258, 1076, 933, 890, 775 \text{ cm}^{-1}$). As bandas 1258 e 930 cm^{-1} podem ser atribuídas à vibração $\text{S} = \text{O}$ dos grupos sulfato e $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ de 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose, respectivamente.

A região entre 800 e 850 cm^{-1} é usada para inferir a posição dos grupos sulfato nos agarocolóides. As bandas $845, 830$ e 820 cm^{-1} são atribuídas à presença de 4-sulfato, 2-sulfato e 6 sulfato da D-galactose, respectivamente. Esse espectro de infravermelho apresenta baixa intensidade na banda 850 cm^{-1} , atribuída à substituição

de grupos sulfato no C-4 da galactose. A presença de um ombro quase imperceptível em 820 cm^{-1} pode sugerir um baixo grau de substituição de sulfato no C-6. A ausência de banda em 805 cm^{-1} indica que galactose-2-sulfato e o sulfato do C-2 de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose não estavam presentes.

Indícios de proteínas são evidenciados pelo aparecimento de picos em 1654 cm^{-1} (íons carboxilato e amida I) e em 1563 cm^{-1} (Amida II) (GROSEV; BOZAC; PUPPELS, 2001).

TABELA 7: Atribuições no espectro do infravermelho para polissacarídeos de algas marinhas, sobretudo de rodófitas

Número de onda (cm^{-1})	Atribuições	Referência
1653	(COO^-), Amida I	a
1640	H_2O	c
1562	Amida II	a
1380 – 1355	Éster Sulfato	bc
1250 – 1240	$\text{O} = \text{S} = \text{O}$ (estiramento assimétrico)	bcd
1080 – 1040	Esqueleto de galactanas ($\text{C} - \text{O} + \text{C} - \text{OH}$)	be
930	$\text{C} - \text{O} - \text{C}$ de 3,6-anidrogalactose	bcd
900 – 890	Banda específica do ágar	e
850	Galactose-4-sulfato	f
820 – 810	Galactose-6-sulfato	bcd
740 – 725	$\text{C} - \text{O} - \text{C}$ de ligação glicosídica	e
716	$\text{C} - \text{O} - \text{C}$ de ligação glicosídica	e
580	$\text{O} = \text{S} = \text{O}$	b

a: Grosev; Bozac; Puppels, 2001.

b: Prado-Fernández *et al.*, 2003.

c: Rochas; Lahaye; Yaphe, 1986.

d: Chopin; Whalen, 1993.

e: Mollet; Rahaoui, Lemoine, 1998.

f: Chopin ; Kerin ; Mezerolle. 1999.

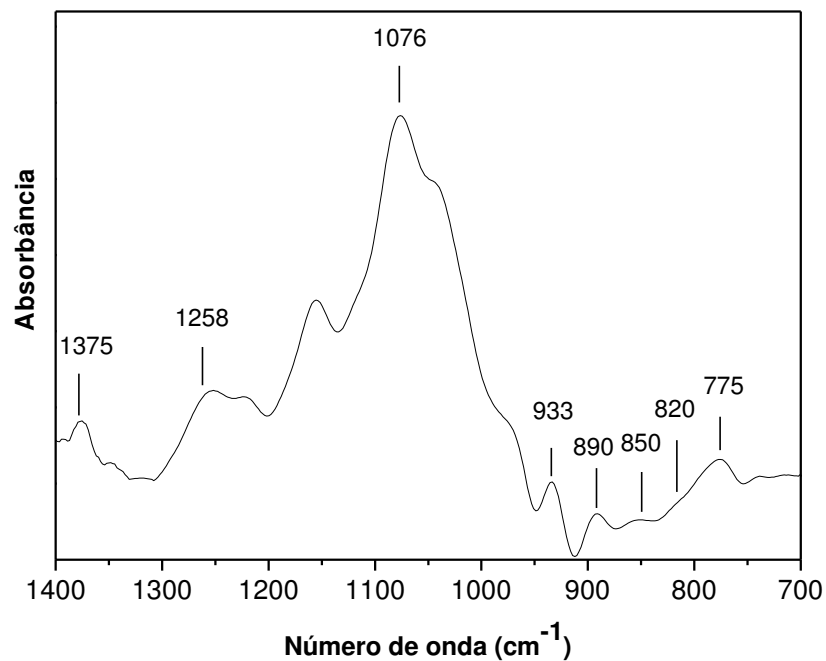


FIGURA 10: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração de polissacarídeos extraída à temperatura ambiente.

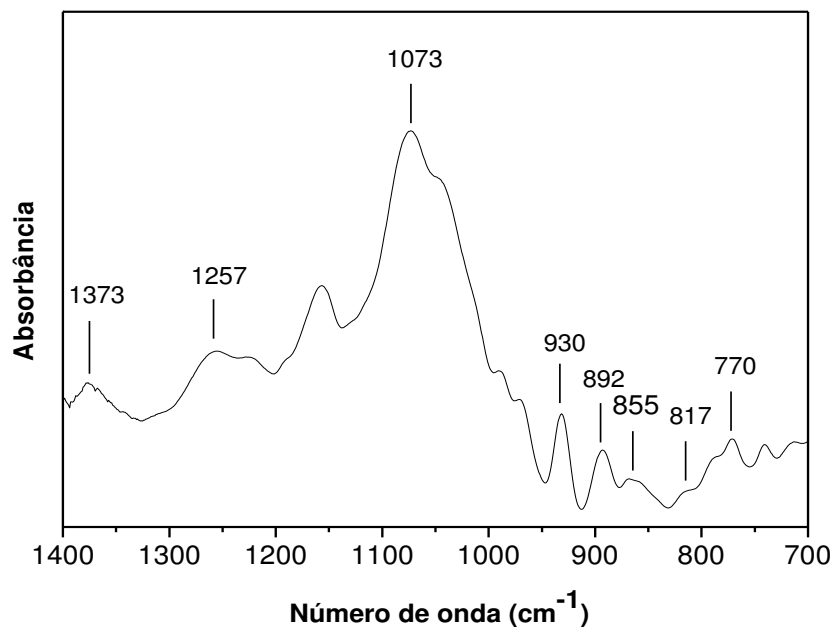


FIGURA 11: Espectro de absorção na região do infravermelho da fração de polissacarídeos extraída à 100° C.

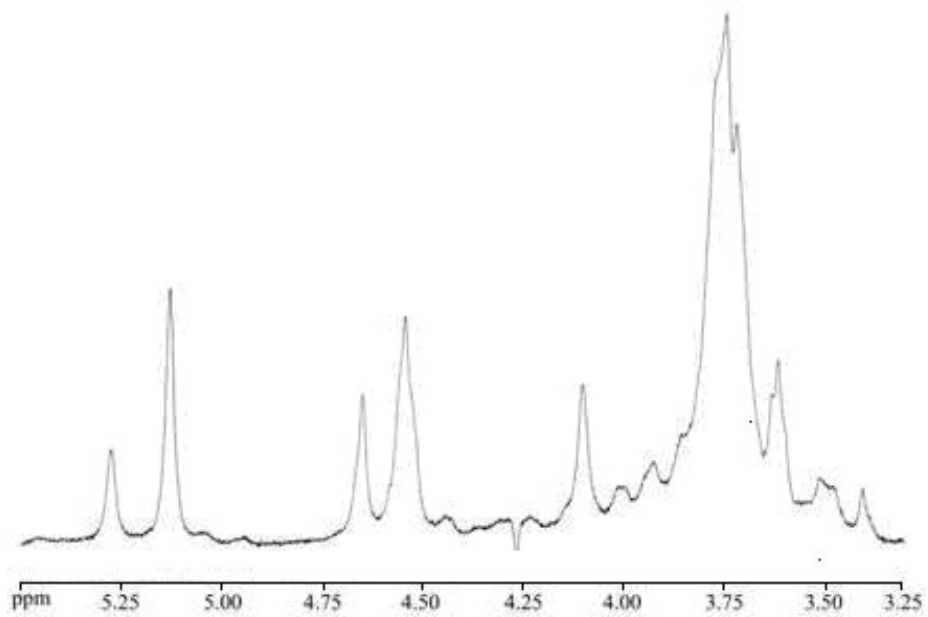
4.2.3. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H

Ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensionais foram utilizadas para investigar a estrutura dos polissacarídeos extraídos à temperatura ambiente e à 100 °C da alga *G. birdiae*. Os espectros de RMN de ^1H de ambas as amostras são complexos (FIGURA 12). Os sinais devido aos prótons anoméricos α em $\sim \delta$ 5,13 e δ 5,28 foram atribuídos à 3,6 α -L-anidrogactose (LA) e α -L-gactose-6-sulfato (L-6S), respectivamente. O resíduo L-6S é um precursor biológico do LA. No espectro do resíduo à quente (GB-q) a razão das áreas dos sinais, devido à LA e L-6S, é superior a encontrada na amostra extraída a frio, indicando uma maior proporção de LA no material extraído à quente.

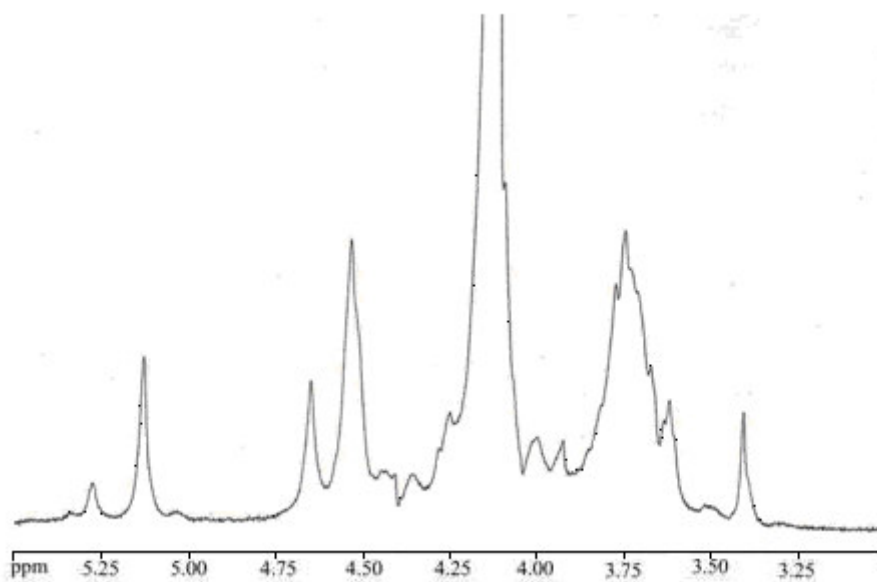
Os prótons anoméricos (H-1) de β -D-gactose (G') ligada à α -L-gactose-6-sulfato (L-6S), e de β -D-gactose (G) ligada a 3,6 α -L-anidrogactose (LA) foram evidenciados em $\sim \delta$ 4,43 e 4,54, respectivamente.

O sinal em $\sim \delta$ 3,40 é atribuído na literatura (USOV *et al.*, 1997) à presença do grupo metoxila (O-CH₃) em resíduos de gactose. Esse sinal é bem mais intenso na extração a 100 °C do que na extração à temperatura ambiente.

A amostra extraída a frio, por ser menos viscosa, permitiu a obtenção de espectros de RMN mais resolvidos e serviu para fazer as atribuições de H e C nos espectros de RMN dos polissacarídeos da *G. birdiae*.



(a)



(b)

FIGURA 12: Espectro de RMN de ^1H do polissacarídeo de *G. birdie*: (a) extraído a frio e (b) extraído à 100° C.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração GBF é mostrado na FIGURA 13. A região de carbono anomérico (δ 90 – 110) apresentou 4 sinais, os quais foram atribuídos tomando como base os dados da literatura (USOV *et al.*, 1997, USOV *et al.*, 1980 e VALIENTE *et al.*, 1992) como C-1 de β -D-galactose (G') ligado a α -L-galactose-6-sulfato (L-6S) em δ 103,7; C-1 de β -D-galactose ligado a 3,6 α -L-anidrogalactose em δ 102,6, C-1 do resíduo de α -L-galactose-6-sulfato (L-6S) em δ 101,3 e C-1 de 3,6 α -L-anidrogalactose (LA) em δ 98,5.

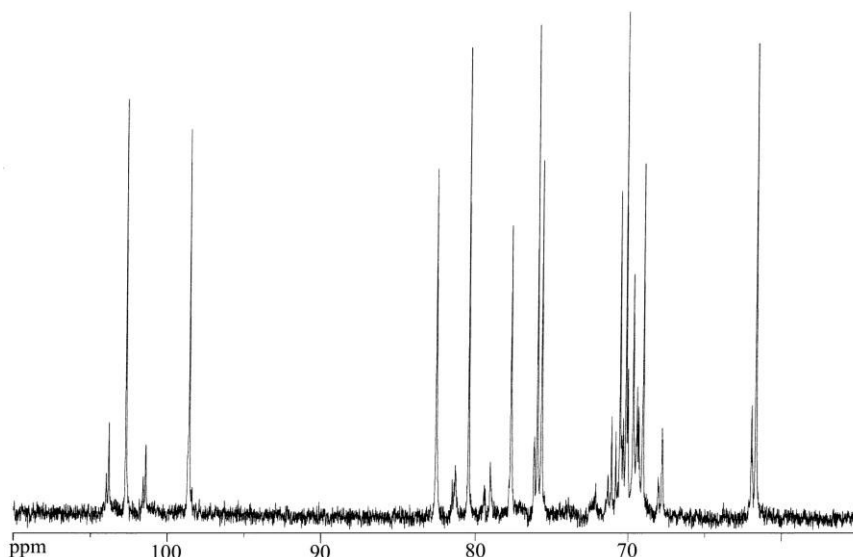


FIGURA 13: Espectro de RMN de ^{13}C do polissacarídeo de *G. birdiae* extraída à temperatura ambiente.

O espectro de DEPT 135 da GB-f (FIGURA 14) mostra 4 sinais de CH_2 em δ 69,6; 67,7; 61,5 e 61,9 atribuídos aos resíduos de LA, L-6S, G' e G, respectivamente.

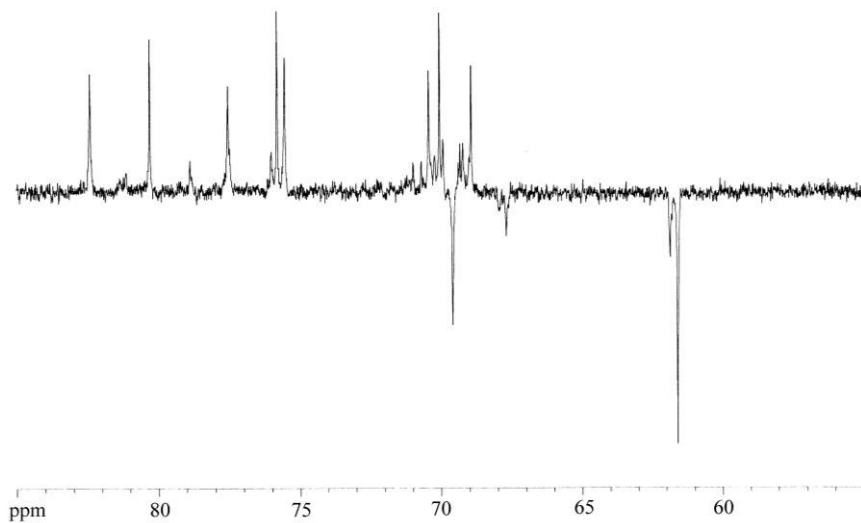


FIGURA 14: Espectro de DEPT 135 de *G. birdiae* extraída à temperatura ambiente

A razão entre as áreas das unidades L e D do polissacarídeo da GB-f foi calculado utilizando a equação abaixo:

$$R_{LD} = A_{102,6} + A_{103,7} / A_{101,3} + A_{98,5} \text{ (onde A é a área da integral de um pico).}$$

A proporção de unidades L (3,6 α -L-anidrogactose (LA) e α -L-gactose-6-sulfato (L-6S) e as unidades D (β -D-gactose) para *G. birdiae* extraída a frio é de 1,01. Esse resultado é muito próximo da proporção ideal do ágar, como observado para o polissacarídeo de *G. verrucosa* (CRAIGIE; WEN; VAN DER MEER, 1984) (TABELA 8).

Uma composição monossacarídica aproximada pode ser obtida a partir das integrais dos sinais de C-1 para a fração GB-f. Esta fração possui 9,2% de α -L-gactose-6-sulfato (L-6S), 40,5% de 3,6 α -L-anidrogactose (LA) e 50,3 de β -D-gactose (G). A Tabela 8 mostra a razão gactose (G) / anidrogactose (LA) para a fração GB-f comparada à outros polissacarídeos do gênero *Gracilaria*. Foi observada

uma elevada razão G / LA para *Gracilaria birdiae*, entretanto, este valor é compatível ao obtido para *G. tikvariae* (CRAIGIE; WEN; VAN DER MEER, 1984).

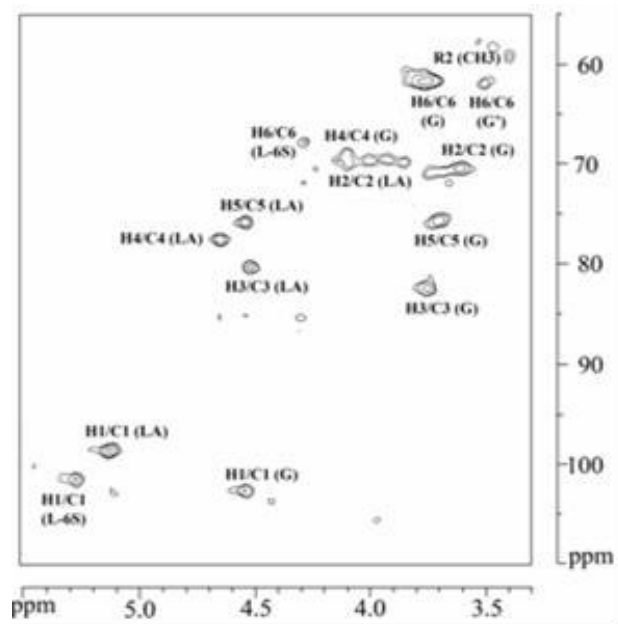
TABELA 8: Comparação entre agars de diferentes espécies de *Gracilaria*.

Espécie	Razão	Razão	NaSO ₃	Referência
	Gal. /Anidrogal.	L / D		
<i>G. tikvahiae</i>	1,41	0,83	4,3	Craigie et al.,1984
<i>G. sjoestedtii</i>	1,15	1,15	2,3	Craigie et al., 1984
<i>G. textorii</i>	0,94	0,94	13,9	Craigie et al., 1984
<i>G. dominguensis</i>	1,69	nd	7,6	Valiente et al., 1992
<i>G. mammillaris</i>	1,27	nd	8,9	Valiente et al., 1992
<i>G. cornea</i>	2,65	1,83	4,8	Melo et al., 2002
<i>G. birdiae</i> (frio)	1,47	1,01	6,4	
<i>G. birdiae</i> (quente)	–	–	1,36	

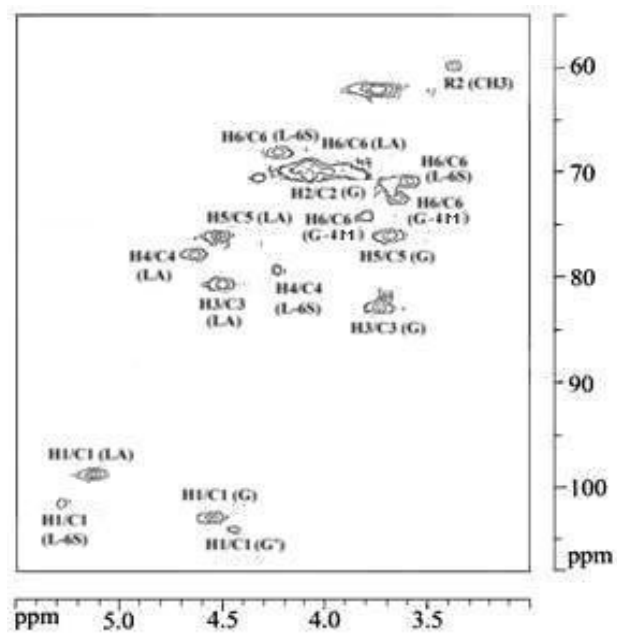
O espectro de HMQC para ambas as frações são mostradas na FIGURA 15. Nos espectros do polissacarídeo extraído a frio (GB-f) podem ser observadas as correlações dos carbonos anoméricos com seus respectivos prótons em $\delta 103,7 / 4,43$ para o resíduo de G'; $\delta 102,6 / 4,54$ para o resíduo G; $\delta 101,3 / 5,28$ para o resíduo L-6S e $\delta 98,5 / 5,13$ para os resíduos LA. Resultados semelhantes foram encontrados para o GBQ. Porém, um sinal em $\delta 59,1 / 3,40$ é observado mais intensamente no espectro de HMQC da GBF que na GB-q, atribuído ao sinal do – O – CH₃ da galactose.

No espectro da GBF foi possível correlacionar os sinais observados no DEPT com seus respectivos prótons $\delta 69,6 / 4,10$; $\delta 67,7 / 4,30$; $61,6 / 3,7$ e $61,9 / 3,5$, respectivamente para LA, L-6S, G e G'. Estes sinais também foram obtidos para GB-q.

As correlações H-1 / H-2 e H-2/ C-2 foram obtidas nos espectros de COSY e HMQC em $\delta 5,13 / 4,09$ (C-2 $\delta 70,0$) para LA; $\delta 5,29 / 3,85$ (C-2 $\delta 69,8$) para L-6S; $\delta 4,43 / 3,72$ (C-2 $\delta 70,8$) para G' e $\delta 4,54 / 3,62$ (C-2 $\delta 70,5$) para G na amostra GB-f. Correlações similares foram obtidas para GBQ (FIGURA 16).

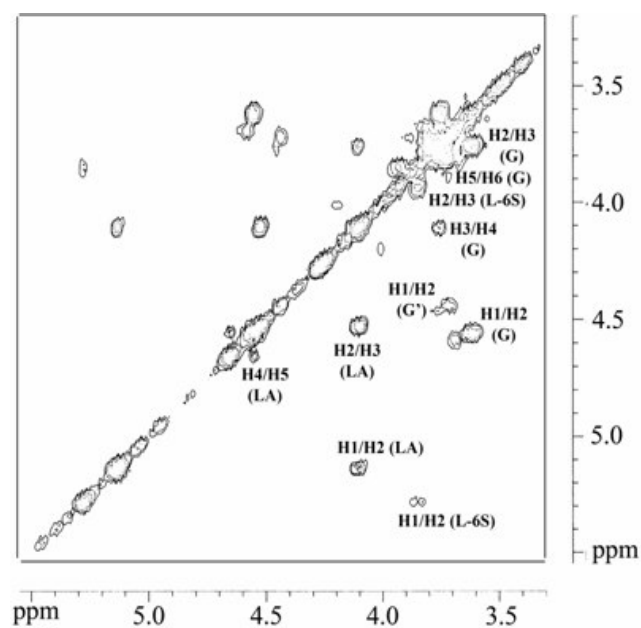


(a)

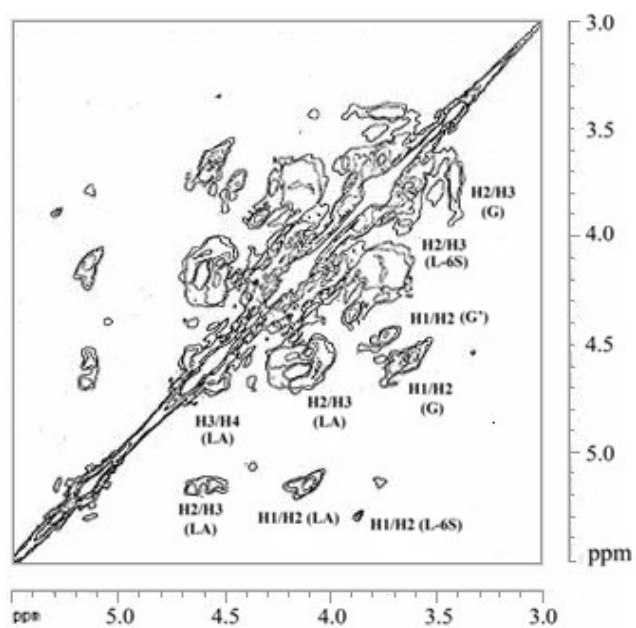


(b)

FIGURA 15: Espectro de HMQC do polissacarídeo de *G. birdiae*: (a) extraído à temperatura ambiente e (b) extraído a 100° C.



(a)



(b)

FIGURA 16: Espectro Cosy do polissacarídeo de *G. birdiae*: (a) extraído à temperatura ambiente e (b) extraído a 100° C.

As correlações de H-2 / H-3 e H-3 / C-3 também foram observadas para os quatro resíduos nos espectros de COSY e HMQC, respectivamente em H-2 / H-3 de G δ 3,62 / 3,75 (C-3 δ 82,4); H-2 / H-3 de LA δ 4,09 / 4,52 (C-3 δ 80,5) e H-2 / H-3 de L-6S δ 3,85 / 3,94 (C-3 δ 3,85 / 3,94) para a fração GBF e em δ 3,63 / 3,74 para H-2 / H-3 de G (C-3 δ 82,6); δ 4,11 / 4,54 para H-2 / H-3 de LA (C-3 δ 80,5) e δ 3,85 / 3,93 para H-2 / H-3 de L-6S (C-3 δ 69,6) para a fração à quente.

As correlações H-3 / H-4 foram visualizadas em δ 3,75 / 4,12 (C-4 δ 68,4) e δ 4,55 / 4,65 (C-4 δ 77,7), respectivamente para G e LA de GBF e em δ 4,52 / 4,66 (C-4 δ 77,7) para LA de GBQ. Para a fração GBF também foram observadas as correlações de H-4 / H-5 em δ 4,64 / 4,55 (C-5 δ 75,9) para o resíduo LA e H-5 / H-6 em δ 372 / 376 (C-5 δ 75,5).

TABELA 9: Assinalamentos de referência do espectro de RMN de ^{13}C .

Unidade de resíduo	^{13}C Carbono sinais químicos							
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Me	
Usov et al. (1980)								
(G-LA)n	G	102.3	70.1	82.2	68.6	75.2	61.3	
	LA	98.2	69.7	80.0	77.2	75.5	69.7	
G6M-4S		102.4	70.0	80.0	71.5	70.8	70.0	59.0
Lahaye et al. (1989)								
(G-LA)n	G	102.4	70.2	82.2	68.8	75.3	61.4	
	LA	98.3	69.9	80.1	77.4	75.7	69.4	
(G'-L6S)	G'	103.7	69.8	81.2	69.1	75.9	61.8	
	L6S	101.3	69.3	71.1	79.1	70.3	67.9	
Miller e Furneaux (1997)								
(G6M-A)	G6M	102.3	70.1	82.1	69.0	73.5	71.7	59.1
	LA	98.2	69.9	80.1	77.3	75.5	69.3	
Lai e Lii (1998)								
(G-LA)n	G	102.4	70.2	82.3	68.7	75.3	61.4	
	LA	98.2	69.9	80.1	77.3	75.6	69.4	
Valiente et al.(1992)								
(G-LA)n	G	102.4	70.1	82.1	68.4	75.6	61.4	
	LA	98.3	69.8	80.1	77.4	75.6	69.3	

Baseado nessas análises bidimensionais e comparando com os dados da literatura foi possível atribuir os sinais de ^1H e ^{13}C para as amostras de *G. birdiae* extraídas a frio e a quente.

TABELA 10: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de Gb-f

Resíduo	^1H assinalamento químico (ppm)					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
β -D-galactopiranosil	4.54	3.62	3.75	4.12	3.72	3.76
3,6- α -L-anidrogactose	5.13	4.09	4.53	4.64	4.55	4.10
α -L-galactose-6-sulfato	5.28	3.85	3.94	nd	nd	4.30
β -D-galactose ligada a L-6S	4.43	3.72	nd	nd	nd	3.51
	^{13}C assinalamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-galactopiranosil	102.6	70.5	82.4	68.9	75.5	61.6
3,6- α -L-anidrogactose	98.5	70.0	80.5	77.7	75.9	69.6
α -L-galactose-6-sulfato	101.3	69.9	69.3	78.9	71.0	67.7
β -D-galactose ligada a L-6S	103.7	70.8	80.3	69.2	76.0	61.9

nd: não detectado

TABELA 11: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de Gb-q

Resíduo	^1H assinalamento químico (ppm)					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
β -D-galactopiranosil	4.56	3.86	3.76	4.12	3.72	nd
3,6- α -L-anidrogactose	5.14	nd	4.53	4.67	4.55	3.94
α -L-galactose-6-sulfato	5.29	nd	nd	4.26	3.62	4.27
β -D-galactose ligada a L-6S	4.45	nd	nd	nd	nd	nd
	^{13}C assinalamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-galactopiranosil	102.7	70.1	82.6	69.1	75.7	nd
3,6- α -L-anidrogactose	98.6	nd	80.5	77.6	75.9	69.6
α -L-galactose-6-sulfato	101.4	nd	nd	79.1	70.5	67.8
β -D-galactose ligada a L-6S	103.8	nd	nd	nd	nd	nd

nd: não detectado

4.2.4. Viscosidade da Solução do Polissacarídeo de *G. birdiae*

A viscosidade intrínseca das soluções de polímeros é um ensaio importante para a caracterização do comportamento viscosimétrico e de suas propriedades de escoamento tanto de soluções em análises teóricas quanto em aplicações práticas na indústria. O polissacarídeo de *G. birdiae* extraído a 100 °C foi submetido à análise viscosimétrica e apresentou alta viscosidade e estabilidade à temperatura ambiente, características típicas do ágar.

Soluções de concentração maiores que 1,5 mg / mL apresentaram formação de gel e, conseqüentemente, perda da propriedade de escoamento pelo capilar utilizado no experimento. A figura 17 mostra o comportamento viscosimétrico da solução do polissacarídeo de *G. birdiae* e, diferentes concentrações, sob temperatura controlada de 25 °C.

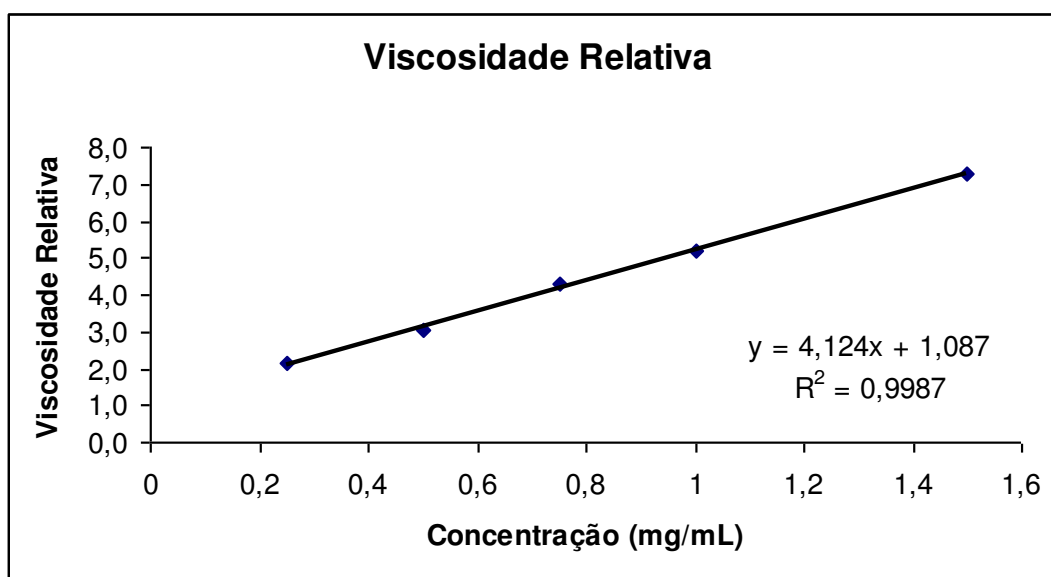


FIGURA 17: Efeito da concentração na viscosidade relativa da solução de polissacarídeo de *G.birdiae*.

4.3. Avaliação Toxicológica do Polissacarídeo de *G. birdiae*

4.3.1. Toxicidade Aguda

A avaliação da toxicidade aguda em camundongos mostrou ausência de indícios de toxicidade, como alterações nas mucosas, pele, pêlo, olhos, comportamento e, sobretudo, morte dos animais envolvidos no experimento. Dessa forma, sugere-se que, quando submetidos às doses de 0,5; 1,0 e 2,5 mg / 100 g de animal, administrados via intraperitoneal, o polissacarídeo de *G. birdiae* não apresenta toxicidade em camundongos.

4.3.2. Toxicidade Subcrônica

4.3.2.1. Variação da Massa Corpórea dos Animais

Durante o experimento, observaram-se pequenas alterações na massa corpórea tanto em machos quanto em fêmeas. A figura 18 mostra o acompanhamento semanal do peso dos ratos durante o experimento e sugere-se ausência de sinais de toxicidade do polissacarídeo de *G. birdiae* (dose de 50 mg / 100 g de animal, por via oral) sobre a massa dos animais, uma vez que as variações de massa ocorreram tanto em animais do grupo controle quanto do grupo teste, inclusive de forma semelhante. Ainda, pode-se observar que tanto animais do grupo teste quanto do grupo controle ganharam massa no decorrer do experimento.

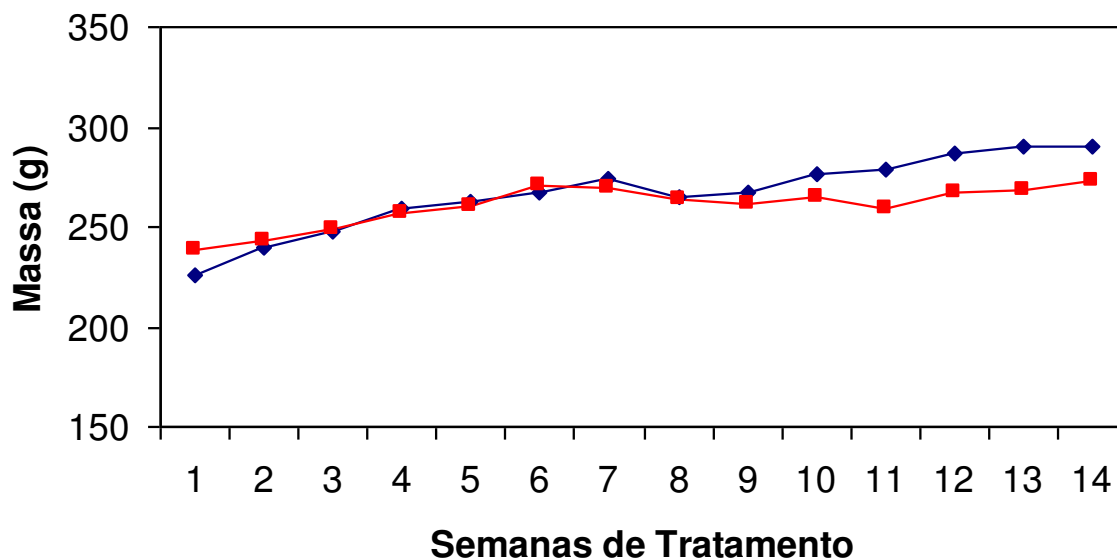


FIGURA 18: Acompanhamento da massa corpórea dos ratos submetidos ao experimento(—◆— Grupo Controle —■— Grupo Teste).

4.3.2.2. Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

A avaliação de parâmetros hematológicos é uma importante ferramenta para avaliação da toxicidade subcrônica em animais. O possível efeito toxicológico do polissacarídeo de *G. birdiae* foi inicialmente avaliado quanto ao número de leucócitos totais do grupo controle e do grupo teste, representado na figura 19. O discreto aumento de leucócitos do grupo teste em relação ao grupo controle não apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Dessa forma, o resultado sugere a ausência de efeito tóxico de longo prazo sobre o número de leucócitos totais nos animais submetidos ao polissacarídeo de *G. birdiae*.

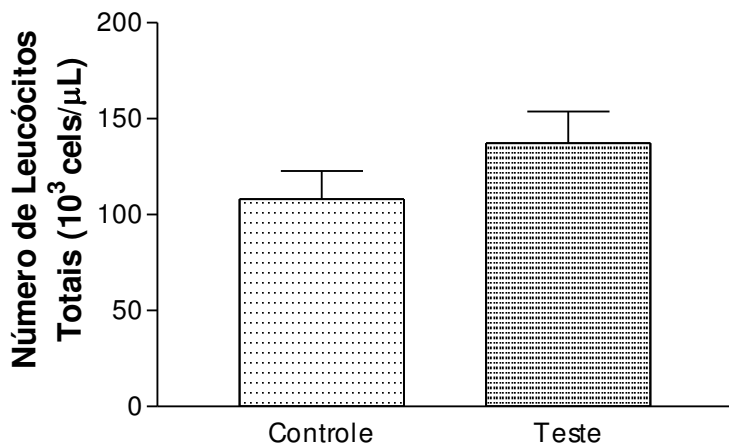


FIGURA 19: Número total de leucócitos totais (10³ cels/μL).

Além da contagem de células, parâmetros bioquímicos também foram analisados para avaliar o potencial tóxico subcrônico do polissacarídeo de *G. birdiae* em ratos. A dosagem de glucose no plasma sanguíneo entre animais do grupo teste e do grupo controle apresentou valores estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$), como demonstrados na figura 20. Relatos sobre o aumento dos níveis de glucose em ratos submetidos a polissacarídeos de origem algal, não foram encontrados na literatura.

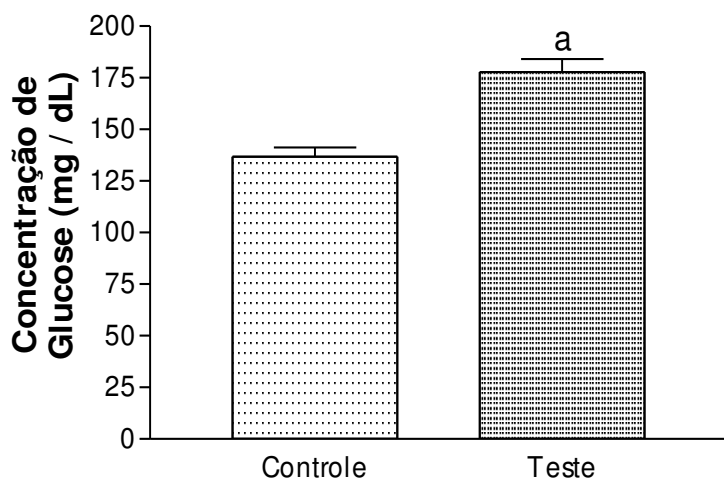


FIGURA 20: Dosagem de glucose no plasma sanguíneo (mg/dL)

Os níveis de proteínas totais (FIGURA 21) e creatinina (FIGURA 22) dos animais submetidos ao polissacarídeo apresentaram uma pequena queda com relação aos seus respectivos grupos controle, enquanto um leve aumento nos níveis de colesterol total foi observado nos animais do grupo teste (FIGURA 23). Apesar das alterações, os níveis de proteínas totais, creatinina e colesterol total não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

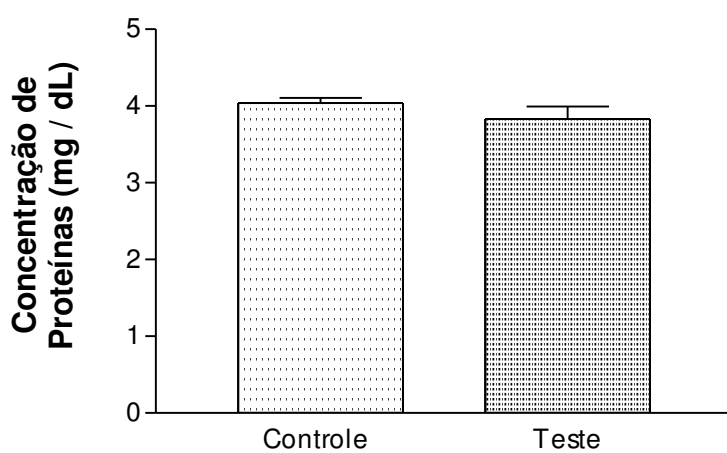


FIGURA 21: Dosagem de proteínas totais (mg/dL)

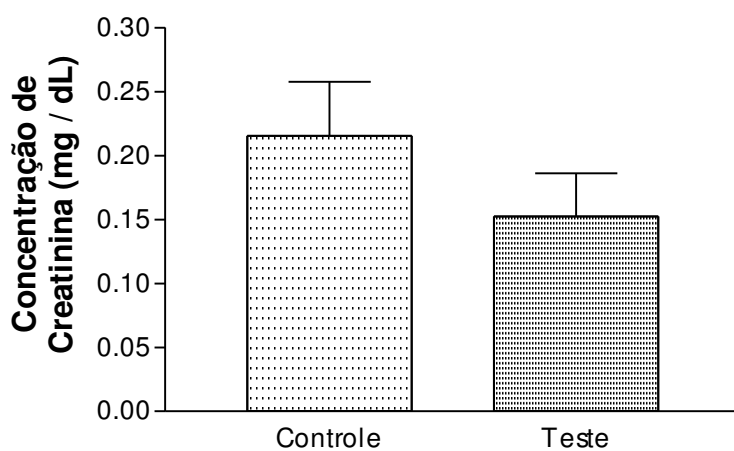


FIGURA 22: Dosagem de creatinina (mg / dL)

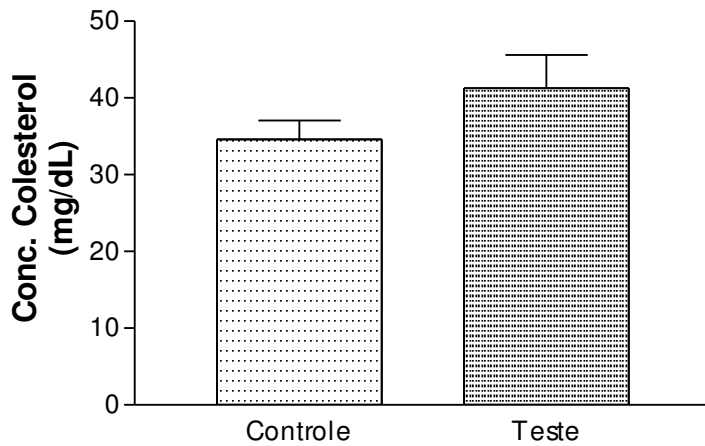


FIGURA 23: Dosagem de colesterol total (mg / dL)

As avaliações dos níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) fornecem importantes informações sobre toxicidade hepática. Nesse trabalho, os animais submetidos ao polissacarídeo apresentaram leve aumento nos níveis de AST e ALT (FIGURAS 24 e 25) com relação aos seus respectivos grupos controle, porém, essas alterações não são estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

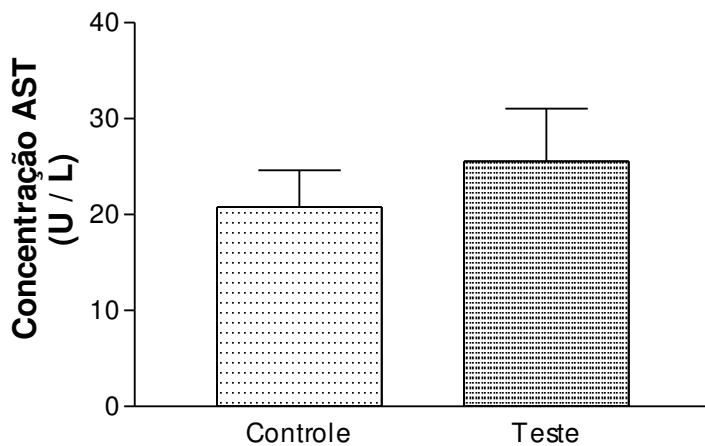


FIGURA 24: Níveis de AST (U/L)

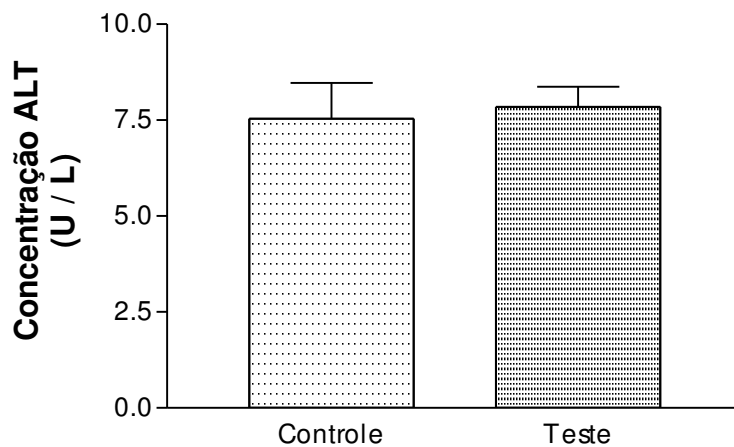


FIGURA 25: Níveis de ALT (U/L)

4.3.2.3. Avaliação Histopatológica

A análise de cortes histológicos dos órgãos dos animais submetidos ao experimento tem como objetivo avaliar alterações microscópicas nos tecidos provocadas pela administração do polissacarídeo de *G. birdiae* durante os 90 dias de experimento. A avaliação consistiu em comparar os cortes histológicos de baço, coração, estômago, fígado, intestino, pulmão e rins, quanto aos indícios básicos de toxicidade e inflamação, nos órgãos dos animais do grupo teste e do grupo controle.

O baço dos animais submetidos ao tratamento com polissacarídeo apresentou poupa vermelha homogênea que, apesar da intensa vascularização, não apresentou sinais de hemorragias. Observam-se ainda os nódulos esplênicos, formados principalmente pelo acúmulo de linfócitos B, e a bainha de linfócitos perivasculares, formada pelos linfócitos T, além das artérias centrais, nitidamente organizados.

Os cortes histológicos do músculo estriado cardíaco dos animais do grupo teste e controle não apresentaram sinais de hemorragia. Pôde-se observar nitidamente a

estriação transversal das células musculares, bem como os discos intercalares, que ligam uma célula a outra e transferem o estímulo contrátil entre as células vizinhas.

A região do corpo do estômago foi analisada e verificou-se ausência de infiltrados celulares nos tecidos e homogeneidade nas camadas de células que compõe a parede do órgão. A muscular da mucosa, as glândulas fúndicas (responsáveis pela produção de ácido clorídrico e pepsina), fossetas e o epitélio superficial foram identificados e apresentaram padrões semelhantes entre animais do grupo teste e do grupo controle.

Os cortes histológicos de fígado, tanto dos animais do grupo teste quanto do grupo controle, apresentaram lóbulos hepáticos estruturalmente homogêneos, sem alterações estruturais nos cordões dos hepatócitos. Também não foram observados sinais de hemorragia ou edema.

A análise histológica do intestino indicou ausência de sinais de toxicidade ao polissacarídeo administrado, apesar do grupo teste ter apresentado sinais de forte descamação da mucosa interna do órgão. Porém, a descamação não deve ter sido causada pelo efeito do polissacarídeo administrado, uma vez que os animais do grupo controle também apresentaram o mesmo sintoma. Provavelmente, a descamação foi causada pelo processo brusco de limpeza do órgão. Além disso, a falta de infiltrados celulares inflamatórios é outro indício de ausência de toxicidade intestinal do polissacarídeo.

A avaliação dos cortes histológicos do pulmão não encontrou sinais de toxicidade. Animais do grupo teste e controle apresentaram brônquios e bronquíolos estruturalmente íntegros, com ausência de hemorragias ou edemas.

Os cortes histológicos de rim foram avaliados e apresentaram medula e córtex homogêneos e integridade estrutural dos glomérulos.

Como resultado da avaliação toxicológica subcrônica, a ausência de alterações celulares ou histológicas, infiltrados de linfócitos, edemas, hemorragias e escamações da mucosa indicam que o polissacarídeo de *G. birdiae* administrado por via oral, dose de 50 mg / g de animal, durante 14 semanas não apresentou sinais típicos de toxicidade em ratos adultos.

5. Conclusão

A caracterização estrutural, realizada por métodos químicos e espectroscópicos do polissacarídeo de *Gracilaria birdiae* extraído à temperatura ambiente e a 100° C constatou que a alga biossintetiza galactanas do tipo agarana, constituída basicamente por resíduos de β -D-galactose e 3,6 α -L-anidrogactose, e com baixa substituição por grupos *O*-metil. Os polissacarídeos extraídos possuem massa molar entre $1,09 \times 10^5$ e $1,11 \times 10^6$ g/mol. A solução do polissacarídeo apresentou alta viscosidade à temperatura ambiente e grande capacidade de formar gel.

A avaliação toxicológica em ratos concluiu que a administração do polissacarídeo não apresentou efeito agudo nas doses de 0,5; 1,0 e 2,5 mg / 100g de animal, via intraperitoneal. A avaliação toxicológica subcrônica também não encontrou relação entre a administração do polissacarídeo (dose 50 mg/g de animal, pela via oral) e a alteração da massa corpórea dos animais e os parâmetros bioquímicos do plasma sanguíneo, com exceção da elevação da taxa de glucose no sangue.

6. Referências Bibliográficas

AMIMI, A., MOURADI, A., GIVERNAUD, T., CHIADMI, N., & LAHAYE, M. Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, 333, 271–279, 2001.

ANDERSON, D.M., GLIBERT, P.M., BURKHOLDER, J.M., Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. **Estuaries** 25 (4B), 704–726, 2002.

ANDRIAMANANTOANINA, H., CHAMBAT, G., & RINAUDO, M. Fractionation of extracted Madagascar *Gracilaria corticata* polysaccharides: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, 68, 77-88, 2007.

ARAKI, C., Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. Proc. Int.Seaweed Symp. 5, 3-19, 1966. apud MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta) **Bioresource Technology**, 96, 379-382, 2005

ARMISEN, R; GALACTAS, F., Podution, properties and uses of agar. In: McHugh, D.J. (ed.), Production and Utilization of Products from Commercial Seaweed. FAO Fish Tech. Paper 288, 1-57, 1987. apud MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta) **Bioresource Technology**, 96, 379-382, 2005.

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L., Algal phylogeny and the origin of land plants. **Plant. Physiol.**, v. 116, p. 9 – 15, 1998

BIRD, C. J., A review of recent taxonomic concepts and developments in the Gracilariaceae (Rhodophyta). **J. Appl. Phycol.** 7: 255–267, 1995.

BOLD, H.C & WYNNE, M.J. Introduction to the algae. Structure and reproduction (2^a Ed.). Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs. 720 p. 1985.

BURIYO, A. S., KIVAISI, A. K., Standing Stock, Agar Yield and Properties of *Gracilaria salicornia* Harvested along the Tanzanian Coast **Western Indian Ocean J. Mar. Sci.** Vol. 2, No. 2, pp. 171–178, 2003

CARDOZO, K. H. M., GUARATINI, T., BARROS, M. P., FALCÃO, V.R., TONON, A. P., LOPES, N. P., CAMPOS, S., TORRES, M. A. , SOUZA, A. O., COLEPICOLO, P., PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact, **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 146 60–78, 2007.

CHOPIN, T., WHALEN, E., A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydr. Res.** 246: 51–59, (1993)

CHOPIN, T., KERIN, B.F., MAZEROLLE. R., Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Phycological Research.** 47 47, 167-88, 1999.

CRAIGIE, J.S., WEN, Z-C., VAN DER MEER, J.P., Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. **Bot. Mar.** 27, 55–61, 1984.

DE RUITER, G. A., RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, 8, 389–395 (1997)

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analyt. Chem.** 28: 350–356, 1956.

ESTEVEZ, J. M., CIANCIA, M., CEREZO, A.S. The system of galactans of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydr. Res.**, AMSTERDAM, V. 339, P. 2575-2592, 2004.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R.H., Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.** 252: 171–182, 1994.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R. H, The structural analysis of disaccharides from red algal galactans by methylation and reductive partial-hydrolysis **Carbohydrate Research** 269, 183-189, 1995.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R. H. Structural analysis of carrageenans from the tetrasporic stages of the red algae, *Gigartina lanceata* and *Gigartina chapmanii* (Gigartinaceae, Rhodophyta) **Carbohydrate Research** 307, 325±331, 1998.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R. H., STEVENSON, D. E. Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta) **Carbohydrate Research** 340, 1149–1158, 2005.

FARIA-TISCHER, P. C. S., Estrutura química, propriedades reológicas e atividade antiviral das galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Meristiella Gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae* (Gigartinales). **Tese de Doutorado**, Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, 2006.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 38, p. 29299–29307, 2000.

FREDERICQ, S., HOMMERSAND, M. H., Comparative morphology and taxonomic status of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) **J. Phycol.** 25: 228–241, 1989a.

FREDERICQ, S., HOMMERSAND, M. H., Proposal of the Gracilariales (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. **J. Phycol.** 25: 213–227, 1989b.

FREIRE-PELEGRÍN, Y., MURANO, E., Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula **Bioresource Technology** 96, 295–302, 2005.

GARGIULO, G.M., DE MAIS, F., TRIPODI, G., Morphology, reproduction and taxonomy of the Mediterranean species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycologia**, 31, 53–80 1992.

GOFF, L.J., MOON, D.A., COLEMAN, A.W., Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). **J. Phycol.** 30: 521–537, 1994.

GROSEV, V. M., BOZAC, R., PUPPELS, G. J. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools **Spectrochimica Acta Part A** 57 2815–2829, 2001.

KARSTEN, U., WEST, J., ZUCCARELLO, G.C., NIXFORD, O., BARROW, K.D., KING, R. J. Low molecular weight carbohydrate patterns in the *Bangiophyceae* (Rhodophyta). **J. Phycol.** Lawrence, v. 35, p 967-976, 1999.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Bot. Mar.**, v. 37, p. 163-169, 1994.

LAHAYE, M., Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry **Journal of Applied Phycology** 13: 173–184, 2001.

LAHAYE, M., YAPHE, W., The chemical structure of agar from *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville, *G. cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. damaecornis* J. Ag and *G. domingensis* Sonder ex Kützing (Gigartinales, Rhodophyta). **Bot. Mar.** 32, 369–377, 1989.

LAHRECH, KH., SAFOUANE, A., PEYRELLASSE, J., Sol state formation and melting of agar gels rheological study **Physica A** 358, 205–211, 2005.

LAI, V.M-F, HUANG, A.-L.; LII, C-Y. Rheological properties and phase transition of red algal polysaccharide-starch composites. **Food Hydrocol.**, Oxford., v.13, p.409-418, 1999.

MABEAU, S., FLEURENCE, J., Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. **Trends in Food Science and Technology** 4, 103–107, 1993.

MELO, M. R. S., FEITOSA, J. P. A., FREITAS, A. L. P., & DE PAULA, R. C. M., Isolation and Characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, 49, 491-498, 2002.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta) **Bioresource Technology**, 96, 379-382, 2005

MARKS, D.L., BAUM, R.B., SWAIN, T., Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins, **Analytical Biochemistry** 147, pp. 136–140, 1985.

MARINHO-SORIANO, E., BOURRET, E., DE CASABIANCA, M.L., MAURY, L., Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastoris*. **Bioresour. Technol.** 67, 1–5, 1999.

MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). **J Biotechnol** 89:81–84, 2001

MILLER, I.J., FURNEAX, R.H., The structural determination of the agaroid polysaccharides from four New Zealand algae in the order Ceramiales by means of ¹³C NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, 333–339, 1997.

MOLLET, J. C., RAHAOUI, A., & LEMOINE, Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). **Journal of Applied Phycology**, 10, 59-66, 1998.

MORRIS, E. R.. Polysaccharide rheology and in mouth perception. In A. M. Stephen (Ed.), Food polysaccharides and their applications (pp. 517–546). New York: Marcel Dekker 1995.

NISIZAWA, K., NODA, H., KIKUCHI, R., WATAMABA, T.,. The main seaweeds food in Japan. **Hydrobiology** 151-152, 5–29 1987.

NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S. Alkali modification of carrageenans. The cyclization of model compounds containing non-sulfated β -D-galactose units. **Carbohydr. Polym.**, v. 26, p. 1-3, 1995.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In: **The Polysaccharides**; ASPINALL, G.O., Ed. 1st ed.; New York: Academic Press; v. 2, pp 195-285, 1983.

PANORAMA DA AQUICULTURA. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. V. 7, n. 42, p. 42 – 45, Disponível em <http://www.panoramadaaquicultura.com.br>>. Acesso em: 1.12.2002. 1997

PAPENFUSS, G. F. A review of the present system of classification of the Florideophycidae. **Phycologia**, 5: 247–255, 1966.

PLASTINO, E.M.; OLIVEIRA, E.C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, 41: 389-396, 2002

PRADO-FERNANDEZ, J., RODRIGUEZ-VAZQUEZ, J. A., TOJO, E., ANDRADE, J. M. Quantitation of k-, i- and l- carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, 480, 23-37, 2003.

PRAIBOON, J., CHIRAPART, A., AKAKABE, Y., BHUMIBHAMOND, O., KAJIWARA, T., Physical and Chemical Characterization of Agar Polysaccharides Extracted from the Thai and Japanese Species of *Gracilaria* **ScienceAsia** 32 Supplement 1: 11-17, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6. ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001, 906p.

REES, D. A. Biogenesis of 3-6-anhydro-L-galactose. **Biochemical Journal**, 81, 347–352, 1961 *apud* USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, v.12, p.301-308,1998

ROCHAS, C., LAHAYE, M., YAPHE, W., Sulfate content of carageenan and agar determined by infrared spectroscopy. **Bot. Mar.** 29, 335–340, 1986.

ROUND, F. E. **Biologia das algas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, S. A., 262p,1983.

SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204/205, p. 585-588, 1990.

SMIT, A.J., Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **J. Appl. Phycol.** 16, 245–262, 2004.

SOGIN, M. L.; GUNDERSON, J. H.; ELWOOD, H. J.; ALONSO, R. A.; PEATTIE, D. A. Phylogenetic significance of the Kingdom concept: an unusual eukaryotic 16S-like ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. **Science**, v. 243, p. 75 – 77, 1989.

STANLEY, N.F., Agars. In Stephen AM (ed.), **Food Polysaccharides and Their Applications**. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 187–204, 1995.

STEENTOFT, M., IRVINE, L.M., FARNHAM, W.F., Two species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. **Phycologia** 34, 113-127, 1995.

STORTZ, C.A.; CERESO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Curr. Topics Phytochem.**, v. 4, p. 121-134, 2000 *apud* FARIA-TISCHER, P. C. S., Estrutura química, propriedades reológicas e atividade antiviral das galactanas sulfatadas das algas vermelhas *Meristiella Gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae* (Gigartinales). **Tese de Doutorado**, Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, 2006.

TONELI, J. T. C. L, MURR, F. E. X , PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, Especial, v.7, n.2, p.181-204, 2005.

TRUUS, K., TUVIKENE, R., VAHER, M., KAILAS, T., TOOMIK, P., PEHK, T., Structural and compositional characteristics of gelling galactan from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Ahnfeltiales, the Sea of Japan) **Carbohydrate Polymers** 63 130–135, 2006.

URZI, S.; PLASTINO, S. M. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos **Revista Brasileira Botânica**, São Paulo, V.24, n.4 (suplemento), p.587-594, dez. 2001

USOV, A. I.; BILAN, M.I.; SHASHKOV, A.S. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcereous red alga *Corallina pulifera* (Rhodophyta, Corallinaceae). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 303, p. 93-102, 1997.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, v.12, p. 301-308,1998.

USOV, A. I., YAROTSKY, S. V., & SHASHKOV, A. S. ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers**, 19, 977-990, 1980.

VALIENTE, O., FERNANDEZ, L. E., PEREZ, R. M., MARQUINA, G., & VELEZ, H. Agar oligosaccharides from red Seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder *ex* Kutzing and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. **Botanica Marina**, 35, 77-81, 1992.

VAN DE VELDE, F. Structure and function of hybrid carrageenans **Food Hydrocolloids** 22, 727–734, 2008

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VIEIRA, R. C. C., **Atlas de mecanica dos fluidos : fluidodinamica**. Sao Paulo: E. Blucher: Ed. da USP, 281p, c1971.

VILLANUEVA, R.D., PAGBA, C.V., MONTANO, N.E., Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides* Harvey. **Bot. Mar.** 40, 369–372, 1997.

YAMAMOTO, H.. An evaluation of some vegetative features and some interesting problems in Japanese populations of *Gracilaria*. **Hydrobiologia** 116/117:51-54, 1984. *apud* (URZI; PLASTINO, 2001)