



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

GLAUBER CRUZ LIMA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
GASTROPROTETOR E ANTI-INFLAMATÓRIO DO POLISSACARÍDEO
SULFATADO DA ALGA VERMELHA *Pterocladia beachiae* FRESHWATER**

FORTALEZA

2019

GLAUBER CRUZ LIMA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
GASTROPROTETOR E ANTI-INFLAMATÓRIO DO POLISSACARÍDEO
SULFATADO DA ALGA VERMELHA *Pterocladia beachiae* FRESHWATER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Ponte Freitas.

FORTALEZA

2019

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)

L698c Lima, Glauber Cruz.

Caracterização químico-estrutural e avaliação dos efeitos gastroprotetor e anti-inflamatório do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Pterocladia beachiae* Freshwater / Glauber Cruz Lima. – 2019.

101 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. macroalgas vermelhas. 2. polissacarídeo sulfatado. 3. *Pterocladia beachiae*. 4. gastroprotetor. 5. anti-inflamatório. I. Título.

CDD 572

GLAUBER CRUZ LIMA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
GASTROPROTETOR E ANTI-INFLAMATÓRIO DO POLISSACARÍDEO
SULFATADO DA ALGA VERMELHA *Pterocladia beachiae* FRESHWATER

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em 29 de Março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Ponte Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Jeanny da Silva Maciel
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Alana de Freitas Pires
Centro Universitário Estácio do Ceará

Prof. Dr. Ariclecio Cunha de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Renan Oliveira Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho às pessoas responsáveis pela minha criação, formação intelectual e construção do meu carácter.

Minha mãe Fátima Maria, Meu pai José Valmir, Minha avó Maria Umbelina, Minha tia Rosalba – “Tia Bá” e a meus dois avôs João Cruz Filho e João Correia Lima – *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à minha família pelo apoio e confiança depositada em mim nesses últimos quatro anos, de muito trabalho e privações mas também, por outro lado, de muita aprendizagem e crescimento.

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Ponte Freitas, por abrir as portas do laboratório para mim e ser uma orientadora sempre solícita, preocupada e amável.

Aos professores Alana Pires, Ariclecio Cunha de Oliveira, Renan Oliveira e Jeanny Maciel que gentilmente se dispuseram a ler, corrigir e participar desta sessão de defesa de doutorado.

Aos amigos mestrandos e doutorandos do Laboratório da Algas Marinhas – Francisco Clark, Felipe Bezerra, Willer Malta, Luís Eduardo Costa, Poliana Alencar, Diego Chagas, Carla Vivianne, João Bosco e Lindauro Junior. Amigos com os quais compartilhei não só trabalhos, estudos e escritas de dissertações e teses, mas também o aprendizado de se fazer pesquisa séria e de qualidade no nosso país. Nosso convívio, além de muitas estórias divertidas e engraçadas, que levarei sempre comigo, foi de fundamental importância para meu crescimento profissional, como pesquisador e professor, e pessoal. Obrigado por tudo, pessoal.

Aos amigos pós-graduandos de outros laboratórios, centros e instituições – Venícios Sombra, Natália Pires, Pedro Everson e Lucas Nicolau. Sem a valiosa contribuição de cada um de vocês, a realização desta tese não teria sido possível. Muito obrigado.

Aos alunos de iniciação científica, de diversos centros, que muito contribuíram na realização dos trabalhos – Victor Hugo, Valesca Ingrid, Vanessa Ferreira e Gutierrez Freitas.

Agradecimento especial à Prof^a. Dr^a. Viviane Portella, à Prof^a. Dr^a. Andreлина Noronha Coelho-de-Souza e ao Prof. Dr. Lúcio Diniz por terem me acolhido em seu laboratório antes mesmo de eu ingressar oficialmente no mestrado, me dando oportunidade de aprender os conceitos básicos da pesquisa científica. Esse *alicerce acadêmico* foi muito importante ao longo do meu doutorado.

Agradeço também a todos os meus amigos, sejam de Fortaleza ou de Redenção, novos ou antigos, mas que serão sempre parceiros. José Luciano, Ivan Bandeira, Josuélio Braga, Klausen Abreu, Carol Cardoso, Henrique Araújo, Michele Salles,

Jony Kellson, Marcelo Franco, Mauro Vieira, Clodoaldo Queiroz, Amaury Lima, Germano Carvalho e Acélio Sousa.

Aos amigos que já se foram, aos sempre parceiros Giliardo Lima e Antônio Márcio e a querida Bruna Marques, amiga/namorada/noiva/esposa do Felipe.

À Universidade Federal do Ceará – UFC, instituição que mantenho vínculo como estudante e à Universidade Estadual do Ceará – UECE, instituição da qual eu tenho muito orgulho de estar como professor no curso de Medicina.

Às entidades de fomento pelo apoio e suporte financeiro – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À minha namorada Sabrina Brito e toda sua família, incluindo, nosso filhinho de quatro patas, Luke. Não foram tempos fáceis... Escrever tese, preparar aula, estudar para concurso... os *dates* diminuíram de frequência, os poemas (que sempre costumava escrever) se tornaram escassos e até as idas para o interior no fim de semana, para passar algum tempo juntos, ir para a igreja, foram reduzidas. Apesar de tudo, você e sua família sempre me apoiaram. Te amo.

RESUMO

As macroalgas vermelhas (Rhodophyta) são fontes de importantes moléculas bioativas, dentre os quais, destacam-se os polissacarídeos sulfatados, cujo potencial farmacológico é largamente relatado na literatura científica. Assim, este estudo teve por objetivo caracterizar a estrutura química e determinar o potencial gastroprotetor e anti-inflamatório do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Pterocladia beachiae* (PS-Pb). O PS-Pb foi obtido por extração enzimática com papaína e mostrou um grau de sulfonação de 0,32 com massa molar estimada em $2,33 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. A caracterização estrutural foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e ressonância magnética nuclear (RMN) e demonstrou que o PS-Pb é um polissacárido sulfatado do tipo ágar e apontaram a presença de xilose em sua estrutura. A atividade gastroprotetora do PS-Pb foi avaliada em modelo animal de úlcera gástrica induzida por etanol. Os resultados mostraram que o PS-Pb (na dose de 3 mg/kg) possui um significativo efeito gastroprotetor associada à redução do dano oxidativo e dos níveis de hemoglobina (indicativo de hemorragia) na mucosa gástrica. O PS-Pb também regulou o fluxo sanguíneo para a camada mucosa, através de modulações com a enzima óxido nítrico sintase (NOS) e o canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}). Para avaliar a atividade anti-inflamatório do PS-Pb, foram usados os agentes flogísticos carragenina e dextrana para induzirem edema em patas de camundongos. O uso do PS-Pb (dose de 3 mg/kg) mostrou-se efetivo em reduzir o edema de pata induzidos por ambos agentes flogísticos. A atividade anti-inflamatória do PS-Pb foi relacionada a sua ação na redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), na peritonite induzida por carragenina, e da imunexpressão de iNOS e TNF- α em tecidos de patas edemaciadas. Portanto, o PS-Pb é considerado um candidato promissor ao tratamento de doenças e complicações inflamatórias e oxidativas.

Palavras-chave: macroalgas vermelhas. polissacarídeo sulfatado. *Pterocladia beachiae*. gastroprotetor. anti-inflamatório.

ABSTRACT

The red seaweeds (Rhodophyta) are sources of important bioactive molecules, among which the sulfated polysaccharides, in which the therapeutic activity is widely reported in scientific literature. Thus, this study aimed to characterize the chemical structure and determine the gastroprotective and anti-inflammatory potential of the sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Pterocladia beachiae* (SP-Pb). The SP-Pb was obtained through enzymatic extraction with papain and showed a degree of sulfonation of 0.32 with molar mass estimated at $2.33 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. The structural characterization was performed through Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) and nuclear magnetic spectroscopy (NMR) and demonstrated that the SP-Pb as an agar-type sulfated polysaccharide and indicated the presence of xylose in its structure. The gastroprotective activity of SP-Pb was evaluated in an animal model of gastric ulcer induced by ethanol. The results showed that the SP-Pb (at the dose of 3 mg/kg) has a significant gastroprotective effect associated with reduction of oxidative damage and hemoglobin levels (indicative of hemorrhage) in the gastric mucosa. The SP-Pb also regulated the blood flow to the mucosal layer through modulations with the enzyme nitric oxide synthase (NOS) and the potassium channel sensitive to ATP (K_{ATP}). To assess the anti-inflammatory activity SP-Pb, the phlogistic agents carrageenan and dextran were used to induce edema in the paws of mice. The use of SP-Pb (at dose of 3 mg/kg) was effective in reducing the paw edema induced by both phlogistic agents. The anti-inflammatory activity of SP-Pb was related to its action in reducing the levels of reactive oxygen species (ROS) in carrageenan-induced peritonitis, and the immunoexpression of iNOS and TNF- α in edematous paw tissue. Thus, the SP-Pb is considered a promising candidate for the treatment of inflammatory and oxidative diseases.

Key-words: red seaweeds. sulfated polysaccharide. *Pterocladia beachiae*. gastroprotective agent. anti-inflammatory agent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas de unidades repetitivas de ágar. A) estrutura de agarose consistindo de β -(1→3) D-galactose e α -(1→4) 3,6-anidro-L-galactose, B) dissacarídeos unidades repetitivas de β -(1→3) D-galactose e α -(1→4) L-galactose. G e LA referem-se a unidades de galactose e 3,6-anidro-L-galactose, respectivamente. R pode ser hidrogênio ou substituintes da cadeia lateral, tais como éster sulfato, éter metílico ou ácido pirúvico	23
Figura 2 – Representação das três principais carragenanas encontradas em algas vermelhas	24
Figura 3 – Causas e respostas fisiológicas da inflamação	27
Figura 4 – Mecanismos de ação dos AINEs. COX, cicloxigenase; PGH ₂ : Prostaglandina H ₂ ; TxA ₂ : Tromboxano A ₂ ; PGD ₂ : Prostaglandina D ₂ ; PGF _{2α} : Prostaglandina F ₂ alfa; PGE ₂ : Prostaglandina E ₂ ; PGI ₂ : Prostaglandina I ₂ (Prostaciclina)	28
Figura 5 – Diagrama descrevendo as ações deletérias diretas e indiretas do etanol sobre a mucosa gástrica, destacando o processo inflamatório e o estresse oxidativo	30
Figura 6 – Alga marinha <i>Pterocladia beachiae</i>	34
Figura 7 – Representação esquemática da extração enzimática do polissacarídeo sulfatado da alga marinha <i>Pterocladia beachiae</i> ...	36
Figura 8 – Cromatograma (GPC) para PS-Pb	48
Figura 9 – Espectro de IVTF do PS-Pb	49
Figura 10 – Cromatograma (GPC) para PS-Pb	50
Figura 11 – Espectros bidimensionais de ¹ H de PS-Pb. A) COSY; B) FASE-TOCSY; C: NOESY	51
Figura 12 – Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do PS-Pb. A) sequestro do radical DPPH; B) quelação de íons ferrosos; C) capacidade antioxidante total; D) sequestro de radicais hidroxila. Média \pm DP	52

Figura 13 – Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (1, 3 e 10 mg/kg; <i>i.p.</i>) no edema de pata induzido por carragenina. Média ± EPM (n=6). * p<0,05 vs. carragenina; # p<0,05 vs. PS-Pb 1 mg/kg. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)	53
Figura 14 – Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (1, 3 e 10 mg/kg; <i>i.p.</i>) no edema de pata induzido por dextrana. Média ± EPM (n=6). * p<0,05 vs. dextrana; # p<0,05 vs. PS-Pb 1 mg/kg. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)	55
Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg; <i>i.p.</i>) sobre a expressão imuno-histoquímica de iNOS e TNF- α em patas com edema induzido por carragenina. Média ± EPM (n=6). * p<0,05 vs. controle; # p<0,05 vs. carragenina; θ p<0,05 vs. carragenina. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)	56
Figura 16 – Mensuração da densidade óptica para A) iNOS e B) TNF- α em patas de camundongos com edema induzido por carragenina. Os animais foram pré-tratados com PS-Pb (3 mg/kg; <i>i.p.</i>), salina ou indometacina (10 mg/kg; <i>i.p.</i>) (400x)	57
Figura 17 – Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg; <i>i.p.</i>) sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal após peritonite induzida por carragenina. Média ± EPM (n=6). * p<0,05 vs. controle; # p<0,05 vs. carragenina. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)	58
Figura 18 – Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (0,3, 3 e 10 mg/kg; <i>p.o.</i>) sobre a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. Média ± EPM (n=6). * p<0,001 vs. salina; # p<0,01 vs. etanol. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)	59
Figura 19 – Efeito do pré-tratamento com PS-Pb sobre o dano histológico da mucosa gástrica (Microfotografia). A) Grupo salina; B) Grupo etanol, mostrando perturbação e descontinuidade da região glandular gástrica superficial com intensa perda celular epitelial (seta preta), edema submucoso (seta vermelha) e hemorragia (seta laranja); C) PS-Pb (3 mg/kg) + etanol absoluto, mostrando	

preservação da mucosa gástrica (100x)	60
Figura20 – Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg; <i>p.o.</i>) de PS-Pb sobre o dano hemorrágico da mucosa gástrica em camundongos tratados com etanol. Média ± EPM (n=6). * $p < 0,05$ vs. salina; # $p < 0,05$ vs. etanol. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)	61
Figura21 – Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg; <i>p.o.</i>) sobre o dano oxidativo da mucosa gástrica em camundongos tratados com etanol. A) níveis de GSH; B) concentração de MDA. Média ± EPM (n=6). * $p < 0,05$ vs. salina; # $p < 0,05$ vs. etanol. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)	63
Figura22 – Avaliação do envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e do canal de potássio sensível a ATP (K_{ATP}) no efeito terapêutico do PS-Pb (3 mg/kg) sobre a lesão gástrica induzida por etanol. Os bloqueadores L-NAME e glibenclamida foram utilizados. Média ± EPM (n=6). * $p < 0,001$ vs. salina; ρ $p < 0,05$ vs. salina; # $p < 0,001$ vs. etanol; θ $p < 0,05$ vs. etanol; δ $p < 0,001$ vs. PS-Pb + L-NAME; λ $p < 0,05$ vs. PS-Pb + L-NAME; Ω $p < 0,05$ vs. PS-Pb + glibenclamida. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise bioquímica do polissacarídeo sulfatado obtido da alga vermelha <i>P. beachiae</i>	47
Tabela 2 – Deslocamentos químicos (RMN) de ^1H and ^{13}C para PS-Pb	50
Tabela 3 – Efeito do PS-Pb (3 mg/kg) na lesão gástrica microscópica induzido por etanol	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	anti-inflamatórios não-esteroidais
BHT	hidroxitolueno butilado
BSA	albumina sérica bovina
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COSY	espectroscopia de correlação bidimensional
COX	enzima cicloxigenase
CPC	cloreto de cetilpiridínio
DBBM	Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
DPPH	radical 1,1difênil-2-picrilhidrazil
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
eNOS	enzima óxido nítrico sintetase endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
GPC	cromatografia de permeação em gel
GSH	glutationa reduzida
HB	hemoglobina
HSQC	coerência quântica heteronuclear única
IBPs	inibidores da bomba de prótons
iNOS	enzima óxido nítrico sintase induzível
IVTF	infravermelho com transformada de Fourier
K _{ATP}	canal de potássio sensível ao ATP
L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginina metil éster
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
MDA	malondialdeído
NF-kB	fator nuclear kappa-B
NOESY	espectroscopia bidimensional do efeito nuclear de <i>Overhauser</i>
NOS	enzima óxido nítrico sintase
PS-Pb	polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha <i>P. beachiae</i>
RMN	ressonância magnética nuclear
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético

TOCSY	espectroscopia de correlação total
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Considerações gerais sobre algas	18
1.2	Importância econômica das algas	19
1.3	Classificação das macroalgas	20
1.4	Polissacarídeos sulfatados de macroalgas	21
1.5	Potencial farmacológico dos polissacarídeos sulfatados	25
1.5.1	<i>Inflamação</i>	26
1.5.2	<i>Úlcera gástrica</i>	29
1.6	Os polissacarídeos sulfatados do gênero <i>Pterocliadiella</i>	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	Geral	32
2.1	Específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Coleta e identificação da alga marinha	34
3.2	Extração e purificação do polissacarídeo sulfatado	35
3.3	Rendimento	36
3.4	Determinação do conteúdo de carboidratos totais	37
3.5	Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes	37
3.6	Determinação do conteúdo de sulfato	38
3.7	Determinação da massa molar	38
3.8	Caracterizações da amostra por métodos espectroscópicos	39
3.8.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)</i>	39
3.8.2	<i>Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	39
3.9	Ensaio de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	39
3.9.1	<i>Ensaio da capacidade antioxidante total</i>	39
3.9.2	<i>Ensaio de sequestro de radicais 1,1difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)</i> ..	40
3.9.3	<i>Ensaio da atividade quelante de íons ferrosos</i>	40
3.9.4	<i>Ensaio de eliminação de radicais hidroxila</i>	41
3.10	Animais	41
3.11	Edema de pata induzido por agentes flogísticos	42

3.11.1	<i>Análise imunohistoquímica para iNOS e TNF-α em patas com edema induzido por carragenina</i>	42
3.12	Avaliação dos níveis de GSH no exsudato peritoneal após peritonite induzida por carragenina	43
3.13	Lesão gástrica induzida por etanol	43
3.13.1	<i>Análise histopatológica das lesões gástricas</i>	44
3.13.2	<i>Quantificação dos níveis de hemoglobina na mucosa gástrica</i>	44
3.13.3	<i>Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica</i>	45
3.13.4	<i>Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica</i>	45
3.13.5	<i>Papel do óxido nítrico (NO) e do canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) na ação do PS-Pb sobre a mucosa gástrica</i>	46
3.14	Análise Estatística	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Rendimento e composição do PS-Pb	47
4.2	Massa molar do PS-Pb	47
4.3	Caracterização do PS-Pb por espectroscopia	48
4.3.1	<i>Espectroscopia na região do infravermelho</i>	48
4.3.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	49
4.4	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do PS-Pb	51
4.5	Efeito anti-inflamatório do PS-Pb no edema de pata induzido por carragenina	53
4.6	Efeito anti-inflamatório do PS-Pb no edema de pata induzido por dextrana	54
4.7	Efeito do PS-Pb na imunoexpressão de iNOS e TNF- α em patas com edema induzido por carragenina	55
4.8	Efeito do PS-Pb nos níveis de GSH do exsudato peritoneal após peritonite induzida por carragenina	58
4.9	Atividade gastroprotetora do PS-Pb na lesão gástrica induzida por etanol	59
4.10	Efeito gastroprotetor do PS-Pb na lesão gástrica microscópica	60
4.11	Ação do PS-Pb sobre os níveis de hemoglobina na mucosa	

	gástrica	61
4.12	Ação do PS-Pb sobre o estresse oxidativo na mucosa gástrica	62
4.13	Papel do óxido nítrico e do canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor do PS-Pb	64
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO A - CERTIFICADO CEUA	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre algas

Algas são um grande e heterogêneo grupo de organismos com similaridades ante as plantas superiores, mas que se distinguem grandemente do reino vegetal quanto à diferenciação e características estruturais (SANGHVI & LO, 2010). A maioria dos organismos classificados como algas, o que engloba desde microalgas até espécies imensas como o *kelp* gigante (*Macrocystis pyrifera*), com mais de 30 metros de comprimento, evoluiu de forma independente nos mais diversos nichos ecológicos em que são encontradas. Portanto, pode-se inferir que a maioria das algas não apresenta nenhuma relação de parentesco entre si, sendo a classificação realizada de modo artificial (FRANCESCHINI et al., 2010; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

A classificação das algas segue ainda amparada em parâmetros bioquímicos como localização e natureza dos pigmentos, dos carboidratos e da disposição das tilacoides, sendo encontrados exemplares em dois dos três domínios da vida, Bacteria e Eucariontes, constituindo assim um grupo polifilético encontrado em praticamente qualquer ambiente aquático (FRANCESCHINI et al., 2010; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011). Uma das razões da quase onipresença de algas nesses habitats é sua grande capacidade de tolerar grandes variabilidades de pH, temperatura e concentrações de CO₂ e O₂. No mar aberto, na região costeira, ou ainda nos habitats de água doce, as algas têm funções comparáveis às plantas terrestres, constituindo-se em produtores primários e base das cadeias alimentares, além de serem responsáveis pela maior parte do oxigênio liberado à atmosfera e pela absorção de cerca de metade do dióxido de carbono (gás preponderante para o aquecimento global) produzido por atividades humanas (BARSANTI et al., 2008; KOUZUMA & WATANABE, 2015; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

As algas são seres de vida livre em suspensão nas águas iluminadas de pouca profundidade (caso das espécies unicelulares), mas também ocorrem como organismos bentônicos vivendo anexadas a rochas, lodo e outras algas ou ainda como organismos pluricelulares macroscópicos, as macroalgas, que há décadas despertam grande interesse comercial ao redor do mundo.

1.2 Importância econômica das algas

A exploração econômica em larga escala de microalgas começou a partir dos anos de 1960, vinte anos após esse período, na década de 1980, a produção, somente na Ásia, já superava os 1000 kg mensais. Atualmente, os gêneros *Chlorella* e *Espirulina* concentram mais de 90% da produção global de biomassa de microalga, movimentando um crescente mercado que gera meio bilhão de dólares por ano ao produzir e comercializar cerca 20 toneladas de biomassa seca (BENEMANN; WOERTZ; LUNDQUIST, 2018; SPOLAORE et al., 2006).

O conteúdo nutricional, com alto teor de proteínas e carboidratos, assim como a pouca quantidade de gorduras, transformou as microalgas em um produto de uso quase universal na indústria alimentícia, sendo largamente utilizada como alimento rico em proteína ou nutracêutico. Cerca de 90% da biomassa produzida é destinada para este fim. Outras utilizações incluem a nutrição animal, podendo ser incorporado a rações para uma ampla variedade de animais, ou ainda o uso biotecnológico, no tratamento de resíduos e recuperação de água e para produção de energia a partir de fonte microbiana (HUSS et al., 1999; SPOLAORE et al., 2006).

Historicamente, muitas espécies de macroalgas fazem parte da dieta de países orientais, principalmente China, Japão e Coreia do Sul, fornecendo uma alimentação saudável, rica em carboidratos, proteínas, minerais, vitaminas e ácidos graxos poli-insaturados (DEL OLMO; PICON; NUÑEZ, 2018; KILINÇ et al., 2013). No Japão, o alto consumo de algas marinhas tem sido associado à inibição do desenvolvimento de tumores malignos, o que leva a baixas taxas de incidência de diversos tipos de câncer, tais como melanoma (TEAS & IRHIMEH, 2017) e câncer de mama na pós-menopausa, e consequente redução da mortalidade (ITO et al., 2018). Para além do câncer, o consumo de uma dieta rica em algas marinhas é, parcialmente, relacionado a baixos níveis de triglicerídeos séricos e complicações cardiovasculares, levando a uma maior qualidade e expectativa de vida (SOBKO et al., 2010).

Nos últimos anos, o consumo de macroalgas cresceu substancialmente nos países ocidentais devido ao reconhecimento do valor nutricional destes organismos, sendo utilizados principalmente como aditivos alimentares. As macroalgas são usadas ainda em cosméticos, fertilizantes e medicamentos (LEE et al., 2017; VIGOR

et al., 2018). Em toda a sua cadeia produtiva, a indústria das macroalgas movimentava cerca de seis bilhões de dólares por ano (CHEN et al., 2017).

1.3 Classificação das macroalgas

As macroalgas são classificadas quanto a uma série de características bioquímicas em três divisões dentro do reino Plantae: filo Phaeophyta (algas pardas), filo Chlorophyta (algas verdes) e filo Rhodophyta (algas vermelhas) (BARSANTI et al., 2008; VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

As algas do filo Phaeophyta possuem sua cor característica devido à presença do carotenoide fucoxantina, o pigmento majoritário destas algas. Embora outros carotenoides, como betacaroteno e xantofilas, também sejam encontrados em quantidades consideráveis, é a cor advinda da fucoxantina que predomina (BONANNO & ORLANDO-BONACA, 2018; YENDE; HARLE; CHAUGULE, 2014). As algas pardas estão distribuídas predominantemente no ambiente marinho, sobretudo em mares de água fria, e além dos carotenoides acima relatados, são ricas em clorofilas dos tipos *a* e *c* (CHEN et al., 2017; O'SULLIVAN et al., 2010). Outra característica marcante das algas pardas é o fato de serem as maiores macroalgas encontradas nos oceanos, tendo a maior parte da sua biomassa produzida por um número reduzido de espécies das ordens Laminariales e Fucales (BONANNO & ORLANDO-BONACA, 2018; LEAL et al., 2013).

Em relação ao filo Chlorophyta, das algas verdes, possuem no interior de suas células as clorofilas *a* e *b*, portanto, os mesmos pigmentos clorofilados encontrados nas plantas, suscitando a teoria de que estas algas são ancestrais longínquos das plantas terrestres. Pigmentos acessórios como carotenos e xantofilas também são abundantes (LELIAERT et al., 2016; TOMITANI et al., 1999). Há uma diversidade notável entre as algas verdes em relação a seu tamanho e habitat. A maioria das espécies é de tamanho microscópico, os exemplares multicelulares raramente ultrapassam um metro de comprimento, outrossim, há uma enorme gama de ambientes aquáticos onde as diversas ordens de Chlorophyta residem, tais como ecossistemas de água doce e marinho, crostas e solos úmidos. Muitas espécies unicelulares são capazes ainda de estabelecerem relações de simbiose com outros organismos, principalmente fungos, formando o líquen (LEWIS & McCOURT, 2004; VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

O filo Rhodophyta, correspondente às algas vermelhas, apresenta cerca de 700 gêneros e entre 4000 a 6000 espécies conhecidas. A cor característica destas algas provém dos pigmentos de ficobilinas, que permitem às algas viverem em ambientes profundos, uma vez que absorvem bem a luz verde e azul-esverdeada que penetra muito além da superfície dos oceanos. As algas vermelhas são quase exclusivamente marinhas e somente cerca de 20 gêneros estão bem adaptados a viverem em águas doces, o que corresponde a 100 espécies diferentes. Há também uma predileção por regiões tropicais quentes, embora alguns exemplares também possam ser encontrados em regiões polares. Estruturalmente, as algas do filo Rhodophyta são complexas e a maior parte delas é classificada como bentônicas macroscópicas, crescendo junto a rochas ou outras espécies de algas (FRANCESCHINI et al., 2010; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Algas vermelhas, assim como as espécies dos demais filios de macroalgas, são ricas em polissacarídeos sulfatados, macromoléculas polianiónicas complexas e heterogêneas formadas por unidades repetitivas de açúcares e carregadas negativamente devido à presença dos grupos sulfatos. A pressão evolutiva foi responsável por desenvolver nas algas moléculas de alta complexidade estrutural, como os polissacarídeos sulfatados, envolvidas na sobrevivência do organismo no hostil ambiente marinho, sujeito a alterações de temperatura, luminosidade, salinidade e desidratação durante marés baixas em zonas costeiras (JIAO et al., 2011; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

1.4 Polissacarídeos sulfatados de macroalgas

O termo polissacarídeo se refere coletivamente a carboidratos que podem ser compostos de unidades repetitivas de monossacarídeos (homopolissacarídeos) ou formados por duas ou mais unidades monoméricas diferentes (heteropolissacarídeos) (PRAJAPATI et al., 2014). Acredita-se que entre as principais funções *in situ* dos polissacarídeos sulfatados está a ação protetora contra a desidratação, durante períodos de maré baixa, e o fato de propiciarem maior flexibilidade às algas, contribuindo para o processo de captura de nutrientes e luminosidade (CABRERA; STORTZ; RODRÍGUEZ, 2014).

Cada filo de macroalga possui especificamente um determinado tipo de polissacarídeo sulfatado nas paredes de suas células. As algas marrons são ricas

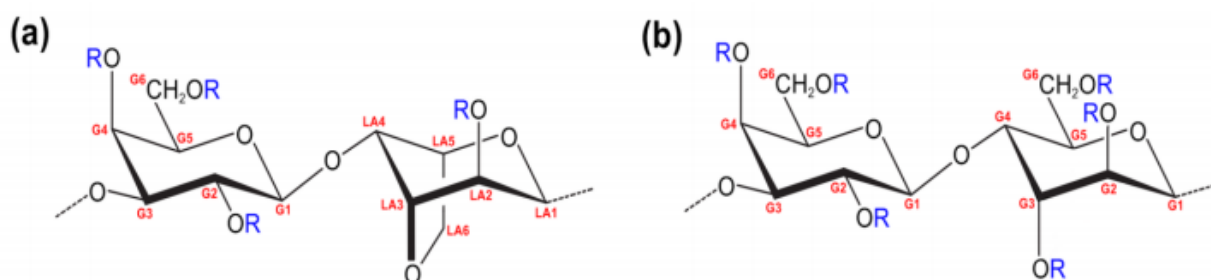
em fucoidanas, polissacarídeo constituído principalmente por sequências de resíduos α -L-fucopiranosose mas cuja estrutura fina varia de acordo com a espécie (MEENAKSHI et al., 2014; VINNITSKIY, et al., 2016). Nestes aspectos, as algas marrons são divididas ainda em dois grupos de acordo com a ligação dos resíduos de fucose em suas cadeias centrais, (1 \rightarrow 3)-ligada a resíduos α -L-fucopiranosose e (1 \rightarrow 4)-ligada a resíduos α -L-fucopiranosose (JIAO et al., 2011). As ulvanas são os polissacarídeos sulfatados formados por unidades repetitivas de dissacarídeos encontrados nas algas verdes. Os principais constituintes das ulvanas são sulfato, ramnose, xilose, ácido idurônico e ácido glicurônico e as unidades dissacarídicas são formadas por ramnose 3-sulfato ligada a D-ácido glicurônico, L-ácido idurônico ou D-xilose. As ligações mais comuns entre os dissacarídeos de ulvanas ocorrem quando D-ácido glicurônico ou L-ácido idurônico se ligam a ramnose 3-sulfato, formando o ácido ulvanobiurônico A e B, respectivamente (KOPEL et al., 2016; LAHAYE & ROBIC, 2007).

Nas algas vermelhas, o polissacarídeo sulfatado é denominado galactana, que por sua vez, é dividido em dois grupos de acordo com a estereoquímica. A unidade básica das galactanas é constituída por cadeias lineares alternadas de duas subunidades. Resíduos β -(1 \rightarrow 3) D-galactopiranosose compõem a subunidade A e estão sempre na configuração enantiomérica D-, enquanto que a subunidade B é formada por resíduos α -(1 \rightarrow 4) galactopiranosose que podem tanto estar na configuração enantiomérica D- ou L-galactana, sendo a galactana classificada como carragenana quando a subunidade B está na configuração D e como agarana quando se encontra na configuração L. Frequentemente as subunidades B ocorrem como 3,6-anidro- α -L-galactose ou 3,6-anidro- α -D-galactose, para agaranas e carragenanas, respectivamente (PEREZ-RECALDE et al., 2016; SILVA et al., 2015; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

As agaranas são compostas de duas partes principais, uma fração cíclica neutra e uma fração aniônica, correspondendo a agaroses e agaropectinas, respectivamente. Agarose é uma molécula linear desprovida de sulfato cuja característica proeminente é a ação geleificante (LI et al., 2008; MUTHUSWAMY et al., 2007). Agaroses consistem de unidades repetitivas de β -(1 \rightarrow 3) D-galactose e α -(1 \rightarrow 4) 3,6-anidro-L-galactose, podendo ainda possuir substituições de resíduos monossacarídeos por 6-O-metil-D-galactose, L-galactose e 2-O-metil-L-galactose (ARMISEN & GALACTAS, 2000). A ação geleificante é desempenhada pela

estrutura tridimensional das agaroses, que retêm água em seus poros (LAHAYE & ROCHAS, 1991). Já as agarpectinas são polissacarídeos ácidos contendo sulfato, ácido pirúvico, grupo metil e ácido D-glucurônico coligados a uma estrutura linear da agarose em diferentes posições na molécula (ARMISEN & GALACTAS, 2000). Diferentes espécies de algas vermelhas apresentam frações diferentes de agarose e agarpectinas, no entanto, a proporção de agarose é sempre superior à de agarpectina, correspondendo a pelo menos dois terços da agarana total encontrada (CARDOSO, 2007). Carragenanas são polissacarídeos sulfatados aniônicos de cadeia linear formados por unidades dissacarídicas repetitivas de β -(1 \rightarrow 3) D-galactopiranosose (unidade G) e α -(1 \rightarrow 4) D-galactopiranosose (unidade D) ou 3,6-anidro- α -D-galactose (unidade DA) encontrados nas macroalgas vermelhas (CAMPO et al., 2009; JIAO et al., 2011) (Fig. 1).

Fig. 1. Estruturas químicas de unidades repetitivas de ágar. A) estrutura de agarose consistindo de β -(1 \rightarrow 3) D-galactose e α -(1 \rightarrow 4) 3,6-anidro-L-galactose, B) dissacarídeos unidades repetitivas de β -(1 \rightarrow 3) D-galactose e α -(1 \rightarrow 4) L-galactose. G e LA referem-se a unidades de galactose e 3,6-anidro-L-galactose, respectivamente. R pode ser hidrogênio ou substituintes da cadeia lateral, tais como éster sulfato, éter metílico ou ácido pirúvico.

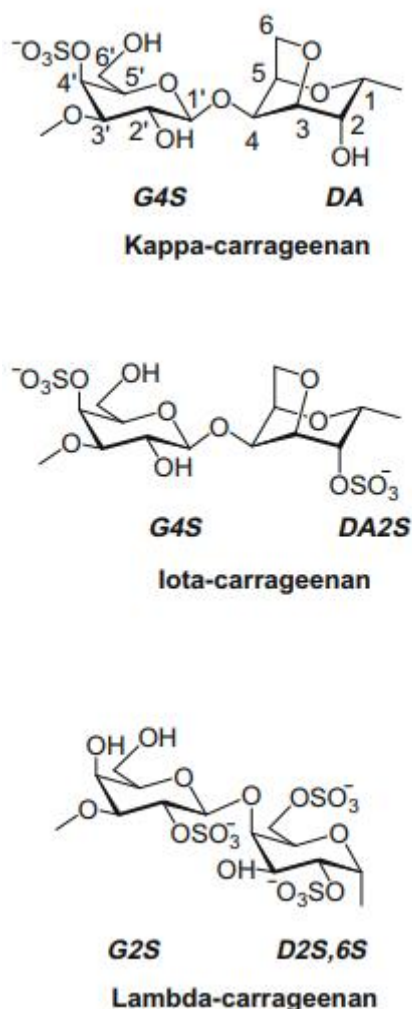


Fonte: LEE et al., 2017

Tradicionalmente, as carragenanas são subdividas de acordo com o padrão de sulfatação e a presença de 3,6-anidro- α -D-galactosepiranosose. As classes mais comuns de carragenanas encontradas são Iota (ι -), kappa (κ -) e lambda (λ -) carragenanas (LIANG et al., 2014; POMIN & MOURÃO, 2008; ZHENG et al., 2019). Cada subtipo difere, notadamente, no número de grupos sulfatos por dissacarídeos. A carragenana do tipo κ possui uma unidade DA e somente um grupo sulfato ligado ao C-4 da unidade G, formando o dissacarídeo G4S-DA. A forma tipo ι também

possui um grupo DA mas apresenta 2 sulfatos por dissacarídeo, um no C-4 da unidade G e outro localizado no C-2 da unidade DA, apresentando a forma G4S-DA2S. A carragenana do tipo λ , por sua vez, forma um dissacarídeo do tipo G-D com três grupos sulfatos ligados ao C-2 da unidade G e aos C-2 e C-6 da unidade D, formando o dissacarídeo G2S-D2S,6S (LV et al., 2015) (Fig. 2).

Fig. 2. Representação das três principais carragenanas encontradas em algas vermelhas.



Fonte: CAMPO et al., 2009

A indústria alimentícia utiliza em larga escala as carragenanas devido suas propriedades reológicas, contudo, cada subtipo apresenta um uso comercial diferente. As κ carragenanas são usadas para formar géis fortes e rígidos, na presença de íons potássio, enquanto as carragenanas do tipo ι formam géis elásticos e macios em solução com íons cálcio. Por fim, as λ carragenanas não

formam géis, sendo utilizadas no processamento de carnes e seus derivados (McHUGH, 2003; PANGESTUTI & KIM, 2014).

A ocorrência natural dos polissacarídeos, no entanto, raramente se dá na forma ideal. O termo unidades repetitivas de dissacarídeo se refere apenas a uma estrutura idealizada, diferentes quantidades de grupos sulfatos, em diferentes posições, distribuídas de forma aleatória na molécula são características comuns dos polissacarídeos (CAMPO et al., 2009; VAN DE VELDE et al., 2002). A frequente substituição de hidroxilas em D-galactose por grupos metil e piruvato também favorece a grande variabilidade existente entre polissacarídeos de diferentes espécies (PANGESTUTI & KIM, 2014).

1.5 Potencial farmacológico dos polissacarídeos sulfatados

Muitos dos medicamentos disponíveis no mercado apresentam um vasto repertório de efeitos colaterais aos pacientes em tratamento. Drogas usadas no tratamento contra o câncer, por exemplo, são largamente reconhecidas por causarem perda de cabelo, vômito, náuseas, leucopenia e neuralgia (CHAN & ISMAIL, 2014; WU et al., 2019). Já os anestésicos opioides, uma classe de medicamento com ação analgésica muito superior a outras drogas, apresentam efeitos colaterais severos, como constipação, náuseas e dependência física. O abuso de remédios derivados do ópio acarreta depressão respiratória e é geralmente fatal (DEL VECCHIO; SPAHN; STEIN, 2017; MANGLIK et al., 2016). Por sua vez, várias classes de drogas usadas no combate à obesidade causam xerostomia (sensação de secura na boca), aumento da pressão sanguínea, constipação, dores de cabeça e insônia (YUN, 2010).

Até mesmo medicamentos de doenças e complicações comuns, que afetam grandes parcelas da população mundial, tais como úlcera gástrica e doenças inflamatórias, exibem grande quantidades de efeitos colaterais. Fármacos como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), uma das classes de medicamentos mais utilizadas no mundo, são agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos eficazes mas desencadeiam complicações cardiovasculares, renais e gástricas (FELSON, 2016; GUNTER et al., 2017; HARIRFOROOSH; ASGHAR; JAMALI, 2013). O uso indiscriminado de AINEs provoca a disruptura da barreira que protege

a camada mucosa do estômago do baixo pH interno característico do órgão (FELSON, 2016).

Uma vez ulcerado, o estômago é tratado com medicamentos (inibidores da bomba de prótons – IBPs – e antagonistas dos receptores da histamina-2) que também possuem uma série de efeitos colaterais, destacando-se dor de cabeça, dor abdominal, ansiedade, diarreia, depressão, tontura, complicações cardiovasculares e trombocitopenia (KUNA et al., 2019). Assim sendo, é necessário que novas pesquisas busquem, principalmente a partir de produtos de origem natural, compostos que mantenham a eficácia do tratamento a doenças e complicações mas que, por sua vez, mostrem uma significativa redução de efeitos colaterais quando comparados a medicamentos de uso tradicional.

A gama de atividades biológicas inerentes aos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas despertaram interesse da indústria farmacêutica e de pesquisadores em uma possível aplicabilidade terapêutica para estas macromoléculas. Dentre suas propriedades farmacológicas já estabelecidas, destacam-se: atividade anticoagulante (LIANG et al., 2014; POMIN, 2014); antiviral (BOUHLAL et al., 2011; PUJOL et al., 2012); antioxidante (FIDELIS et al., 2014); antitumoral (LINS et al., 2009; SENTHILKUMAR et al., 2013); antidiarreica (COSTA et al., 2015; BEZERRA et al., 2018) e imunomodulatória (WONGPRASERT; RUDTANATIP; PRAIBOON, 2014), além de efeitos na redução dos níveis hiperlipidêmicos (QI & SHENG, 2015) e ação neuroprotetora (PANGESTUTI & KIM, 2011).

Pesquisas desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa mostraram, especificamente, que polissacarídeos sulfatos de algas vermelhas têm um grande potencial anti-inflamatório e antinociceptivo (CHAVES et al., 2013; PEREIRA et al., 2014), além apresentar propriedades gastroprotetoras, reduzindo o dano da mucosa gástrica à ulceração induzida por etanol (SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2016).

1.5.1 Inflamação

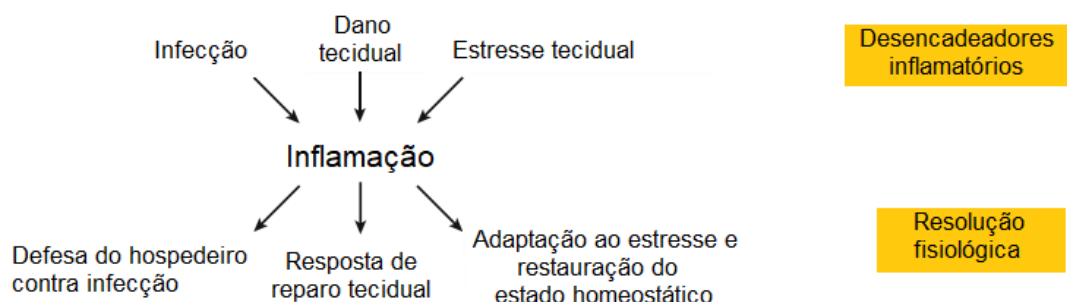
Inflamação é como se denomina a resposta adaptativa a um estímulo nocivo causado, principalmente, por infecção ou lesão tecidual estéril. A resposta completa do hospedeiro é caracterizada com maior acurácia quando ocorrem infecções microbianas. Nestes casos, logo que o estímulo inicial é percebido, por macrófagos e mastócitos nos tecidos, há produção e/ou liberação de vários efetores

inflamatórios, tais como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, aminas vasoativas e eicosanoides para amplificar a resposta imunológica. Uma vez que o processo inflamatório é estabelecido no tecido lesionado, dar-se uma sequência bem padronizada de eventos vasculares e celulares que ocorrem no intuito de findar a infecção e proporcionar reparação tecidual da área lesionada (HEADLAND & NORLING, 2015; MEDZHITOV, 2008) (Fig. 3).

Os eventos vasculares incluem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma dentro do tecido infectado, enquanto que os eventos celulares dizem respeito, principalmente, a mobilização de leucócitos (sobretudo neutrófilos nas inflamações agudas), mas também às mudanças em suas funções, como a secreção de mediadores químicos (KAIN; PRABHU; HALADE, 2014; MASKREY et al., 2011; MEDZHITOV, 2010).

A resposta inflamatória aguda tende à resolução quando o agente lesivo é eliminado e a fase de reparo é iniciada. O processo de restauração da arquitetura tecidual é mediado por macrófagos, sejam residentes ou recrutados, e requer uma mudança no perfil das citocinas produzidas e liberadas, de pró-inflamatório para anti-inflamatório (MEDZHITOV, 2008). Entretanto, se a inflamação falhar em eliminar o agente infeccioso, o retorno à homeostase tecidual não é alcançado, surgindo a inflamação crônica. Esta persistente inflamação tem características novas e é associada a graves desordens e complicações crônicas, tais como doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, doença do intestino inflamado, doenças pulmonares, diabetes e doença de Alzheimer (LEE; NA; SURH, 2013).

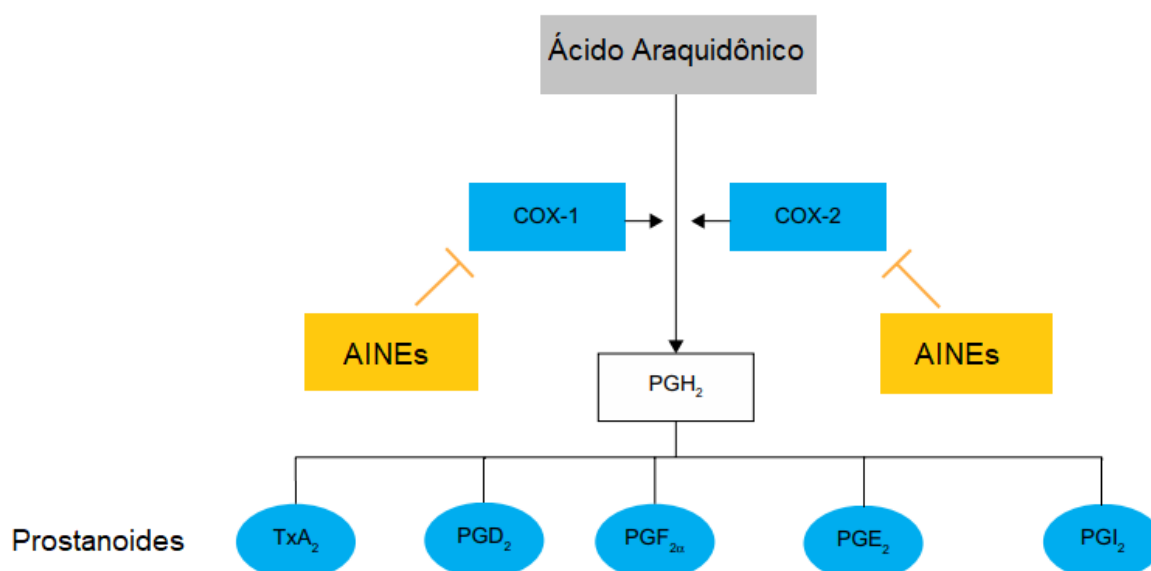
Fig. 3. Causas e respostas fisiológicas da inflamação.



Fonte: Adaptado de MEDZHITOV, 2008.

As principais drogas anti-inflamatórias disponíveis no mercado e usadas na clínica médica são os AINEs. Esta grande e heterogênea classe de medicamentos se liga de forma não específica às enzimas cicloxigenases (COX) 1 e 2, impedindo a cascata de síntese de eicosanoides a partir do ácido araquidônico (BACCHI et al., 2012; CHAN, 2002; PEREIRA-LEITE; NUNES; REIS, 2013) (Fig. 4). No entanto, apesar do efeito terapêutico, os AINEs, ao bloquearem a liberação de prostaglandinas que atuam na formação da camada de muco, expõe a camada mucosa do estômago a ulcerações, mostrando uma correlação entre as doenças inflamatórias e o surgimento, ou desenvolvimento, de úlcera gástricas (BRUNE & PATRIGNANI, 2015; SCHEIMAN, 2016). Como já mencionado, este é somente um dos efeitos colaterais advindos do uso de AINEs, desta forma, pesquisadores estão continuamente buscando novos compostos que possam apresentar promissora atividade anti-inflamatória, mas sem efeitos colaterais ou toxicidade.

Fig. 4. Mecanismos de ação dos AINEs. COX, cicloxigenase; PGH_2 : Prostaglandina H2; TxA_2 : Tromboxano A2; PGD_2 : Prostaglandina D2; $\text{PGF}_{2\alpha}$: Prostaglandina F2 alfa; PGE_2 : Prostaglandina E2; PGI_2 : Prostaglandina I2 (Prostaciclina).



Fonte: Adaptado de BRUNE & PATRIGNANI, 2015.

1.5.2 Úlcera gástrica

Úlcera péptica é como se denomina a lesão induzida por ácido que acomete o trato gastrintestinal, atingindo cerca de 10% da população mundial. A ulceração ocorre principalmente no estômago ou próximo ao duodeno, sendo assim, genericamente, chamada de úlcera gástrica. A lesão completa causa a descontinuidade da camada mucosa, com dano estendendo-se às camadas submucosa e muscular própria. Em estágios incipientes da doença, as lesões não atingem essa profundidade, sendo nomeadas de erosões (LANAS & CHAN, 2017; NARAYANAN; REDDY; MARSICANO, 2018).

O uso contínuo de AINEs e a contaminação pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) são tidos como os dois principais fatores de risco para o desenvolvimento da úlcera gástrica. No entanto, quase metade da população mundial é colonizada com *H. pylori* mas somente uma pequena proporção das pessoas infectadas, ou que usam AINEs continuamente, evoluem com ulcerações gástricas, mostrando que a susceptibilidade individual é um importante fator para a progressão da doença (SIDDIQUE et al., 2018; ZHANG et al., 2014).

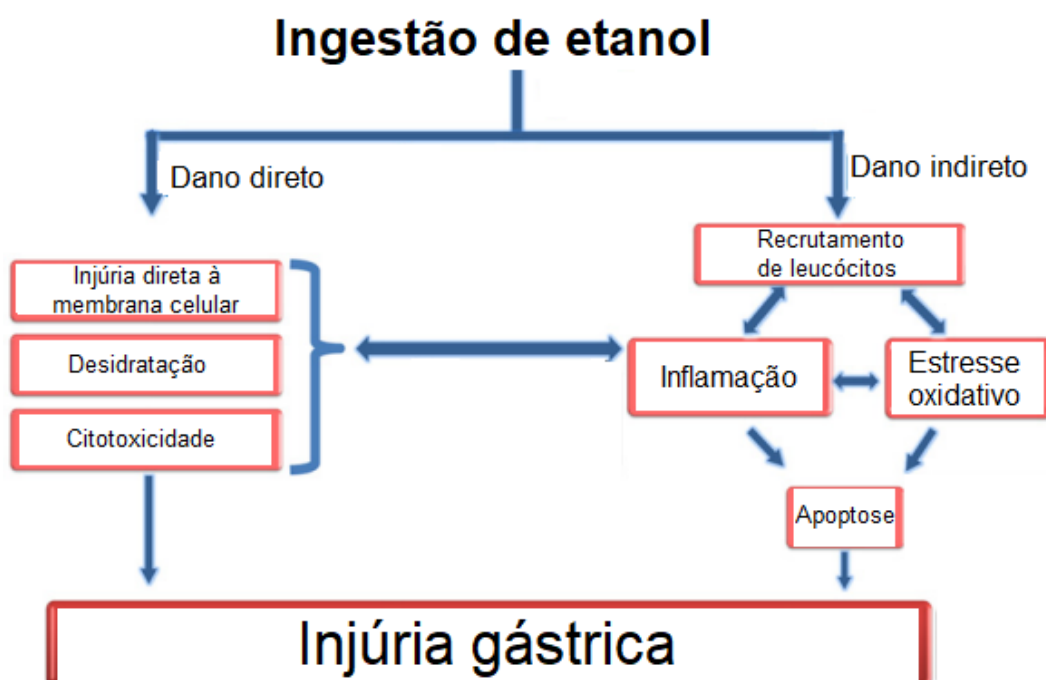
Outros fatores importantes no desenvolvimento das úlceras gástricas são ainda o tabaco, a síndrome Zollinger-Ellison e o etanol. Considerado um problema de saúde pública global, o consumo médio de etanol foi estimado em 6,4 L por pessoa em 2016, resultando em mais de três milhões de mortes em todo o mundo por doenças desencadeadas ou agravadas pelo seu consumo abusivo (SØREIDE et al., 2015; WHO, 2019).

O etanol pode resultar lesão da mucosa gástrica por um processo patológico multifatorial que envolve danos diretos e indiretos (Fig. 5). Os danos diretos correspondem a injúrias na membrana celular das células que compõem o trato gástrico, desidratação e citotoxicidade, já os danos indiretos têm como fator chave o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O desequilíbrio oxidativo, causado pela maior produção de EROs gerados por leucócitos ativados e depleção das defesas antioxidantes, causa lipoperoxidação em moléculas-alvo de células com papel essencial na manutenção das funções fisiológicas do estômago (ARAB et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2019). A injúria tecidual causada pelo etanol é caracterizada por edema e diminuição do fluxo sanguíneo na camada mucosa, esfoliação celular, hemorragia subepitelial, diminuição do grupo sulfidril não-

proteico, liberação de citocinas pró-inflamatórias e modulação do óxido nítrico (NO), que passa a ser produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (BYEON et al., 2018; SIEGMUND; HAAS; SINGER, 2005).

Como muitos polissacarídeos sulfatos obtidos de algas vermelhas já mostraram excelentes ações antioxidantes *in vivo* e *in vitro* (ALENCAR et al., 2019; SOUZA et al., 2012), é natural que estas moléculas sejam consideradas candidatas em potencial para o tratamento das úlceras gástricas. No entanto, como trata-se de uma doença multifatorial, faz-se necessário avaliar as propriedades biológicas dos polissacarídeos sulfatos contra outros fatores desencadeantes, dentre os quais, destaca-se o processo inflamatório.

Fig. 5. Diagrama descrevendo as ações deletérias diretas e indiretas do etanol sobre a mucosa gástrica, destacando o processo inflamatório e o estresse oxidativo.



Fonte: Adaptado de ARAB et al., 2015.

1.6 Os polissacarídeos sulfatados do gênero *Pterocladella*

A grande heterogeneidade estrutural dos polissacarídeos sulfatados contribui para a ampla variedade de atividades biológicas destas moléculas sulfatadas, ao mesmo tempo em que demanda um vasto estudo sobre suas características químicas e potencial farmacológico. Dentre as algas vermelhas sub-estudadas, merece destaque as do gênero *Pterocladella*.

Uma das principais fontes de ágar (PEREIRA; GHEDA; RIBEIRO-CLARO, 2013), as espécies deste recente gênero, proposto por Santelices e Hommersand (1997), já mostraram atividades biológicas promissoras utilizando outras moléculas, como lectinas (SILVA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2002), mas nada se tem relatado na literatura acerca das ações biológicas dos polissacarídeos sulfatados de espécies deste gênero, cuja ocorrência é predominantemente equatorial (HORTA et al., 2001). No litoral cearense encontra-se a espécie *Pterocladella beachiae* Freshwater (*P. beachiae*), uma pequena alga descrita inicialmente por Thomas e Freshwater (2001). Não há relatos na literatura acerca da estrutura do polissacarídeo sulfatado da *P. beachiae* (PS-Pb), nem de qualquer atividade biológica advinda dele. No entanto, a extração e a caracterização do PS-Pb, com o intuito de avaliar seu potencial anti-inflamatório e gastroprotetor é extremamente válido, tendo por base os resultados promissores obtidos pelo nosso grupo de pesquisa na redução da inflamação e no tratamento da úlcera gástrica usando polissacarídeos sulfatados extraídos de algas vermelhas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar a estrutura química e determinar o potencial gastroprotetor e anti-inflamatório do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Pterocladia beachiae*.

2.2 Específicos

- Extrair e purificar o polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Pterocladia beachiae* (PS-Pb);
- Determinar rendimento, conteúdo de carboidratos totais, proteínas contaminantes, conteúdo de sulfato e massa molar do PS-Pb;
- Caracterizar o PS-Pb pelos métodos espectroscópicos infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e ressonância magnética nuclear (RMN);
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do PS-Pb através ensaios capacidade antioxidante total, sequestro de radicais DPPH, atividade quelante de íons ferrosos e eliminação de radicais hidroxila;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório do PS-Pb no modelo de edema de pata;
- Avaliar o efeito do PS-Pb na imunoexpressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da citocina fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em patas com edema induzido por carragenina;
- Determinar os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no exsudato peritoneal após peritonite induzida por carragenina;

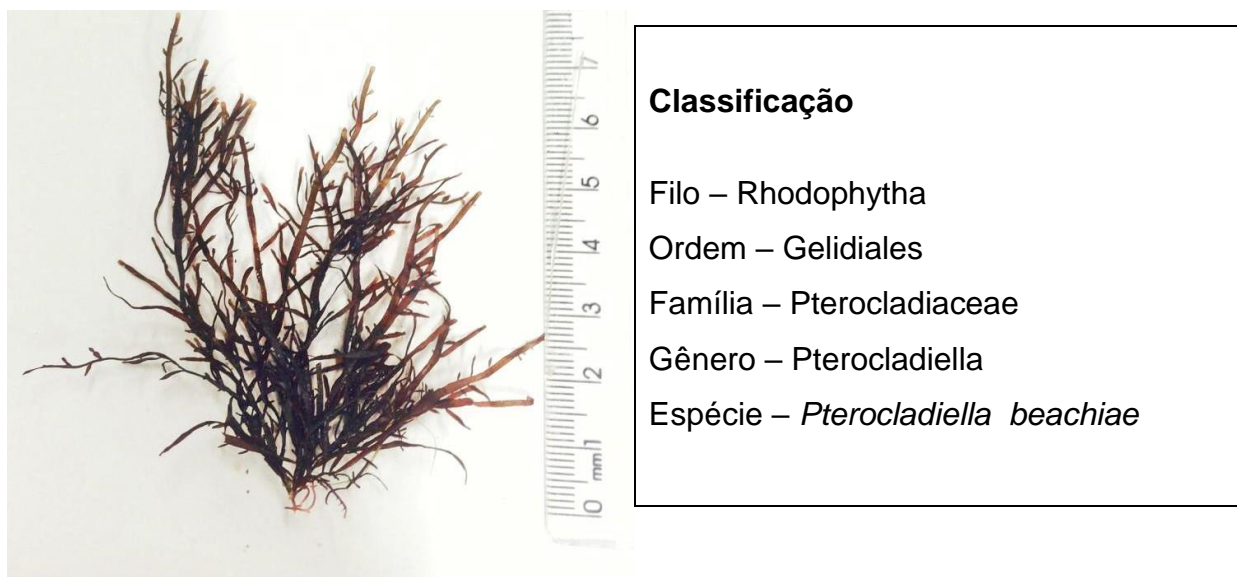
- Avaliar o potencial gastroprotetor do PS-Pb no modelo de lesão gástrica induzida por etanol através de análises macro e microscópicas e por níveis de hemoglobina na mucosa gástrica;
- Determinar os níveis de GSH e a concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica;
- Determinar o papel do óxido nítrico (NO) e do canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) sobre a ação do PS-Pb na mucosa gástrica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação da alga marinha

A alga marinha vermelha *Pterocliadiella beachiae* (Fig. 6) foi coletada, durante o período de maré baixa, na Beira-Mar do município de Fortaleza (Latitude - 3,724 S; Longitude -38,50 O), em Junho de 2016. As amostras coletadas foram transportadas ao Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) em recipiente isotérmico, lavadas em água corrente, livres de epífitas e estocadas a -20 °C para posterior utilização. Uma amostra de *P. beachiae* foi depositada no herbário ficológico do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, da Universidade Federal do Ceará (UFC), sendo registrada sob o número de identificação: 02991.

Fig. 6. Alga marinha *Pterocliadiella beachiae*.



Fonte: Autor.

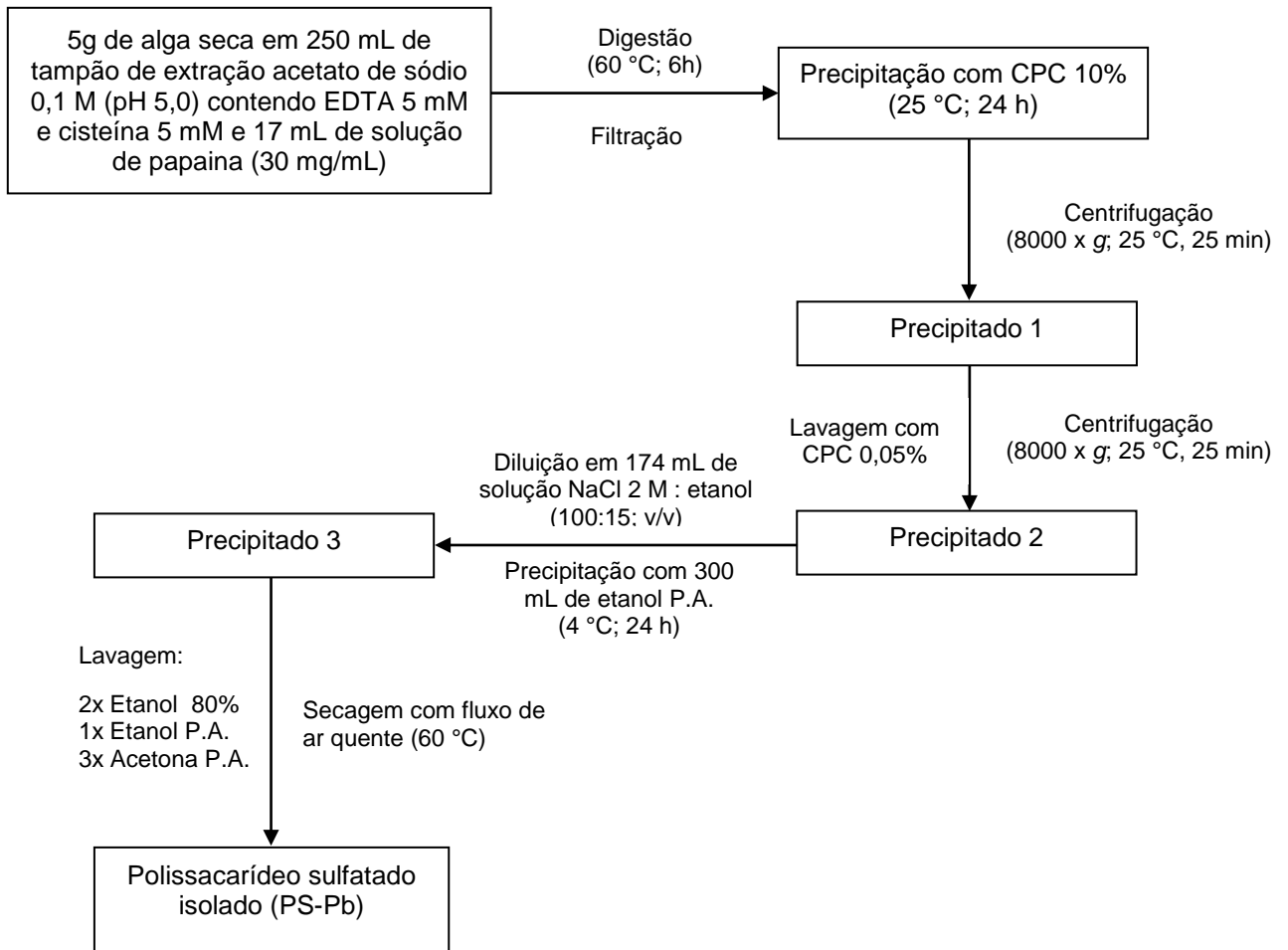
3.2 Extração e purificação do polissacarídeo sulfatado

A extração do polissacarídeo sulfatado da alga *P. beachiae* foi realizada de acordo com Farias et al. (2000), com algumas modificações. Primeiramente, a alga foi desidratada em temperatura ambiente e macerada com nitrogênio líquido. Alga macerada (5g) foi então colocada em contato com 250 mL do tampão de extração acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 5 mM e cisteína 5 mM. A esta solução foi adicionado 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL) e, a seguir, a alga macerada foi incubada a 60 °C durante 6 h em banho-maria.

Em seguida, o material foi filtrado em malha fina e centrifugado (8000 x g; 20 min; 25 °C). Os polissacarídeos presentes no sobrenadante do material centrifugado foram precipitados por adição de 16 mL de uma solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CPC) mantido por 24 h a 25 °C. Após este período, o material foi novamente centrifugado (8000 x g; 20 min; 25 °C) e o sobrenadante descartado. O extrato precipitado foi lavado com 200 mL de solução a 0,05% de CPC, centrifugado (8000 x g; 20 min; 25 °C) e depois dissolvido em 174 mL de solução NaCl 2 M : etanol comercial (100:15; v/v). O polissacarídeo foi novamente precipitado com adição de 300 mL de etanol por 24 h a 4 °C. Após a precipitação, o material foi mais uma vez centrifugado (8000 x g; 20 min; 25 °C) e submetido a duas lavagens com 250 mL de etanol diluído a 80% e uma vez com 300 mL etanol absoluto, seguido de centrifugação (8000 x g; 20 min; 25 °C).

Por fim, foi realizado a lavagem do precipitado com acetona e secagem com fluxo de ar quente para que se obtenha o polissacarídeo sulfatado isolado da alga marinha *Pterocladia beachiae* (PS-Pb).

Fig. 7. Representação esquemática da extração enzimática do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Pterocladia beachiae*.



Fonte: Adaptado de FARIAS et al., 2000.

3.3 Rendimento

Para cálculo do rendimento, foi utilizada a seguinte fórmula.

Teor de polissacarídeo sulfatado (%) = (Massa (g) do extrato seco obtido / massa (g) de alga seca utilizada no processo de extração) x 100

3.4 Determinação do conteúdo de carboidratos totais

A determinação dos carboidratos totais foi realizada seguindo o método proposto por Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013). Foram utilizadas soluções de 1 mg/mL de polissacarídeo sulfatado diluídos em água destilada na razão de 1:50 e 1:80. A partir dessas soluções diluídas, 1 mL foi adicionado rapidamente a 3 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e agitados por 30 s. A solução foi colocada em banho de gelo por 2 min até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a leitura de absorbância a 315 nm em um espectrofotômetro ultravioleta (Novainstruments® Serie 1600). As análises foram feitas em triplicata e a quantificação dos polissacarídeos foi obtida a partir de uma curva de calibração de concentrações crescentes de galactose (10 a 100 $\mu g/mL$).

3.5 Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes

O conteúdo de proteínas contaminantes presentes na amostra foi determinado através do método proposto por Bradford (1976). A solução de Bradford foi preparada da seguinte maneira: 50 mg de Comassie G-250 foram dissolvidos em 25 mL de álcool etílico e agitada durante 1 h em Erlenmeyer envolto com papel-alumínio. Em seguida, foram adicionados 50 mL de ácido fosfórico 85% (H_3PO_4). Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água destilada. A solução resultante foi filtrada três vezes em papel de filtro na ausência de luz e armazenada em frasco âmbar à temperatura ambiente. Para elaboração de uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA), 1 mL de solução de BSA, em diferentes concentrações (5 a 50 $\mu g/mL$), foi misturada a 2,5 mL da solução de Bradford. Após 10 min, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro (Thermo Spectronic®, modelo 20 Genesys) em um comprimento de onda de 595 nm. Todas as concentrações foram analisadas em triplicatas. Para quantificar o teor de proteínas das amostras foram utilizadas soluções de 1 mg/mL de polissacarídeo sulfatado diluídas na proporção 1:10, 1:50 e 1:100. A partir dessas soluções diluídas, 1 mL foi adicionado a 2,5 mL de solução de Bradford. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm. Todas as concentrações foram feitas em triplicata. A estimativa da concentração de proteínas foi realizada através

da correlação entre as leituras das soluções contendo as amostras e a curva padrão de BSA.

3.6 Determinação do conteúdo de sulfato

O conteúdo total de sulfato nos polissacarídeos sulfatados foi determinado por microanálise elementar (Analisador Elementar CHN, Perkin Elmer® 2400). O grau de sulfatação (GS) foi determinado de acordo com método descrito por Melo et al. (2002), a partir dos percentuais de carbono (%C) e enxofre (%S) obtidos.

O método de quantificação baseado na equação abaixo é possível através da estrutura dos polissacarídeos, que são formados por dissacarídeos contendo um β -D-galactopiranosose (unidade A) com outro α -D-galactopiranosose ou 3,6-anidrogactose (unidade B), considerando que o teor de sulfatação é definido como o número de OSO_3^- , ou átomos de enxofre, por unidade dissacarídica repetitiva, com 12 átomos de carbono. Logo, o número 12 multiplicado pela massa atômica do carbono corresponde ao número de carbono por unidade dissacarídica. Equação 1.

$$\text{GS} = \frac{\%S / \text{massa atômica de S}}{\%C \text{ massa atômica de C} \times 12} \quad \text{GS} = 4,5 \times \frac{(\%S)}{(\%C)} \quad (1)$$

3.7 Determinação da massa molar

A massa molar dos polissacarídeos sulfatados isolados foi estimada por cromatografia de permeação em gel (GPC) com concentração de 3 mg/mL de amostra preparada em 0,1 M de NaNO_3 como solvente e filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 μm . A cromatografia foi realizada em temperatura ambiente, usando equipamento da Shimadzu e uma coluna *Ultrahydrogel linear* (7,8 x 300 mm), com fluxo de 0,5 mL/min, com auxílio de detectores de índice refração (RID) e ultravioleta (UV-VIS) a 254 nm. O volume de eluição foi corrigido para o marcador interno de etilenoglicol a 11,25 mL. Amostras de pululano (Showa Denko® – Tóquio, Japão) com massa molar de $5,9 \times 10^3$, $1,18 \times 10^4$, $4,73 \times 10^4$, $2,12 \times 10^5$, $7,88 \times 10^5$ g/mol foram usadas para a confecção da curva padrão.

3.8 Caracterizações da amostra por métodos espectroscópicos

3.8.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

A avaliação da espectroscopia do PS-Pb se deu através da dispersão das amostras em pastilhas de brometo de potássio (KBr). Para a obtenção do espectro foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) da Shimadzu, modelo FTIR-8300, apresentando uma janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

3.8.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ^1H e ^{13}C foram registados utilizando soluções de PS-Pb diluídas a 2,5% p/v em D_2O a 310 K em um espectrômetro Bruker Avance 500 (Bruker Corporation[®] – Massachusetts, MA – EUA) com uma sonda de detecção multinuclear inversa. Os testes realizados foram: coerência quântica heteronuclear única (HSQC), espectroscopia de correlação bidimensional (COSY), espectroscopia de correlação total (TOCSY) e espectroscopia bidimensional do efeito nuclear de *Overhauser* (NOESY).

3.9 Ensaios de atividade antioxidante *in vitro*

3.9.1 Ensaio da capacidade antioxidante total

O ensaio de capacidade antioxidante total foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Este teste baseia-se na redução do molibdato (VI) para o molibdato (V). Inicialmente, amostras de 0,3 mL de PS-Pb em diferentes concentrações (0,1, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL) foram adicionadas a 3 mL de solução contendo H_2SO_4 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM. Estas misturas reacionais foram incubadas a 95 °C durante 90 min. Em seguida, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente até atingirem 25 °C e a absorbância foi medida a 695 nm. O branco foi feito substituindo a amostra

por água destilada. Ácido ascórbico foi usado como controle positivo e considerado como 100% de atividade antioxidante. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante total (%), como mostrado na Equação 2:

$$\text{Capacidade antioxidante total (\%)} = [(A - A_0)/(A_b - A_0)] \times 100 \quad (2)$$

A = A_{695} de reagentes com amostra; $A_0 = A_{695}$ de reagentes com água; e $A_b = A_{695}$ de ácido ascórbico.

3.9.2 Ensaio de sequestro de radicais 1,1difeníl-2-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade de sequestro do radical livre 1,1difeníl-2-picrilhidrazil (DPPH) pelo PS-Pb foi avaliada de acordo com Blois (1958). Amostras de 0,3 mL de PS-Pb em diferentes concentrações (0,1, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL) foram dissolvidas e agitadas em 0,2 mL de metanol (MeOH). Em seguida, adicionou-se DPPH (2,5 mL, 75 μ M em MeOH) para se obter um volume final de 3,0 mL, sendo mantida esta solução em temperatura ambiente e no escuro durante 30 min. Após esse período, a absorbância foi medida em 517 nm. Todas as reações foram realizadas em triplicata e o hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como controle.

O efeito de eliminação do DPPH foi calculado seguindo a equação 3:

$$\text{Eliminação do DPPH (\%)} = [A_0 - (A - A_b)/A_0] \times 100 \quad (3)$$

$A_0 = A_{517}$ do DPPH sem amostra; $A = A_{517}$ da amostra e DPPH; e $A_b = A_{517}$ da amostra sem DPPH.

3.9.3 Ensaio da atividade quelante de íons ferrosos

O ensaio para determinar a atividade de quelação de íons ferrosos foi conduzido conforme descrito por Chew et al. (2008). Nesta ordem, 1 mL de sulfato ferroso 0,1 mM (FeSO_4), 1 mL de PS-Pb em diferentes concentrações (0,1, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL) e 1 mL de ferrozina 0,25 mM (ácido 3-(2-piridil)-5,6-difeníl-1,2,4-triazina-p,p'-dissulfônico de sódio) foram misturados e homogeneizados durante 1 min em

um vórtice. Após 10 min à temperatura ambiente, os valores de absorvância foram medidos em espectrofotômetro a 562 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata. Utilizou-se EDTA como controle positivo. Os resultados foram expressos como capacidade quelante do íon ferroso (%) e calculados como mostrado na equação 4:

$$\text{Capacidade de quelação de íons ferrosos (\%)} = [A_0 - (A - A_b)/A_0] \times 100 \quad (4)$$

$A_0 = A_{562}$ de reagentes sem amostra; $A = A_{562}$ da mistura reacional; e $A_b = A_{562}$ da amostra sem reagentes.

3.9.4 Ensaio de eliminação de radicais hidroxila

A atividade de sequestro do radical hidroxila do PS-Pb foi mensurada de acordo com Smirnoff e Cumbes (1989), com modificações. A mistura reacional (3 mL) foi criada para a realização do ensaio. Esta mistura continha 1 mL de FeSO_4 (1,5 mM), 0,7 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (6 mM), 0,3 mL de salicilato de sódio (20 mM) e diferentes concentrações de PS-Pb (0,1, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL). Ácido ascórbico foi usado como controle positivo e considerado como 100% de atividade antioxidante no sequestro de radicais hidroxila. Após incubação durante 1 h a 37 °C, a absorvância foi medida a 562 nm e a capacidade de eliminação do radical hidroxila foi calculada como mostrado na equação 5:

$$\text{Eliminação radicais hidroxila (\%)} = (1 - [A_{\text{amostra } 562} - A_{\text{controle } 562}]) \times 100 \quad (5)$$

Em que, $A_{\text{controle } 562}$ é a absorvância do controle e $A_{\text{amostra } 562}$ é a absorvância do PS-Pb.

3.10 Animais

Foram utilizados neste estudo camundongos *Swiss* fêmeas adultas, com peso de 25-30g, provenientes do Biotério Central da UFC. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h com livre acesso à água e ração (*ad libitum*). O tratamento dos animais seguiu todas as regras estabelecidas pelo Conselho

Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) em concordância com as diretrizes do *guide for the care and use of laboratory animals*, publicação do *US National Institutes of Health* (NHI publicação nº 85-23, revisada em 1996). O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da UFC e aprovado sob o número 138/17.

3.11 Edema de pata induzido por agentes flogísticos

O modelo de edema de pata proposto por Winter, Risley e Nuss (1962), usa agentes flogísticos para induzir inflamação na pata de murinos e, assim, avaliar o potencial anti-inflamatório dos compostos em teste. Neste ensaio foram utilizados os agentes flogísticos carragenina e dextrana.

Inicialmente foi usada a carragenina com os animais divididos nos seguintes grupos experimentais (n=6): solução salina (controle negativo), carragenina e PS-Pb + carragenina (PS-Pb usado nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg). O ensaio com dextrana foi conduzido com o mesmo desenho esquemático. Carragenina (500 µg/pata, 100 µL) e dextrana (500 µg/pata, 100 µL) foram administrados na pata traseira direita por injeção intraplantar (*i.pl.*). O PS-Pb foi administrado via *i.p.* 30 min antes do estímulo inflamatório.

O edema foi medido por hidropletismometria, de acordo com a diferença entre o tempo zero e as medidas posteriores.

3.11.1 Análise imunohistoquímica para iNOS e TNF- α em patas com edema induzido por carragenina

Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981). Os animais foram pré-tratados com PS-Pb (3 mg/kg, *i.p.*), solução salina ou indometacina (10 mg/kg, *i.p.*), 60 min antes da administração de carragenina (*i.pl.*) (500 µg/pata).

Os animais foram sacrificados 3 h mais tarde e seções de 5 mm da região plantar da pata injetada com carragenina foram imersas em formaldeído tamponado a 10% durante 48 h para processamento histológico. Seções (5 µm) da pata, desparafinadas e reidratadas, foram imersas em tampão citrato 0,1 M (pH 6) sob aquecimento de micro-ondas durante 18 min para recuperação do antígeno. Após o

resfriamento à temperatura ambiente, os cortes foram lavados com solução tamponada com fosfato, seguida de bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% e incubação durante a noite (4 °C) com os anticorpos primários (anti-iNOS e anti-TNF- α) de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, as seções foram lavadas em tampão fosfato-salino (PBS) e incubadas durante 30 min com o anticorpo secundário de coelho biotilado (anti-IgG) (diluição 1:200 em PBS) e incubadas (30 min) com o complexo conjugado de estreptoavidina peroxidase usando ABC Vectastain[®] (Vector Laboratories – Burlingame, CA - EUA). Por fim, os cortes foram corados com 3,3-diaminobenzidina-peróxido (DAB), contra-corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados em lâminas de microscópio para análise. Os dados foram semiquantificados, como densidade óptica relativa, com o software Image J[®] (NIH, Bethesda, MD – EUA).

3.12 Avaliação dos níveis de GSH no exsudato peritoneal após peritonite induzida por carragenina

Inicialmente, uma peritonite foi induzida pela administração de carragenina (*i.p.*) (500 μ g/cavidade). Os animais foram previamente (30 min antes da injeção de carragenina) tratados com PS-Pb (3 mg/kg) ou salina (*i.p.*). Em seguida, 400 μ L do sobrenadante do exsudato peritoneal foram misturados com 800 μ L de tampão Tris 0,4 M e 20 μ L de ácido 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,01 M. As amostras foram agitadas por 3 min e a absorbância mensurada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 412 nm (SEDLAK & LINDSAY, 1968). Os resultados foram expressos como μ g de GSH/mL de exsudato peritoneal.

3.13 Lesão gástrica induzida por etanol

As lesões gástricas foram induzidas por administração oral (*per os; p.o.*) de etanol absoluto, de acordo Robert et al. (1979), com modificações. Inicialmente, os animais foram colocados em jejum de 12 h, em seguida, divididos randomicamente em cinco grupos (n=6). Após este período, três grupos foram pré-tratados com PS-Pb (*p.o.*), diluído em solução salina, nas doses de 0,3, 1 e 3 mg/kg. Após 30 min do

pré-tratamento, as lesões gástricas foram induzidas por administração de etanol absoluto (0,5 mL/25 g). Os grupos controles receberam somente solução salina ou salina + etanol. Após 1 h da indução das lesões gástricas, os animais foram sacrificados e seus estômagos rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura, lavados em solução salina e estirados sobre uma superfície plana. Imagens digitais foram capturadas com um referencial métrico para posterior análise macroscópica das lesões (hemorrágicas ou ulcerativas) usando o programa planimétrico Image J[®] (National Institutes of Health, NIH – Bethesda, MD – EUA).

3.13.1 Análise histopatológica das lesões gástricas

Amostras de estômago foram cuidadosamente retirados e armazenados em paraformaldeído 10% tamponado por no máximo 2 dias, até o processamento histológico ser iniciado. As peças foram então retiradas do paraformaldeído 10% tamponado e seccionadas em pequenas fatias de 4 µm de espessura e cortadas nos planos longitudinal e transversal para posterior preparação das lâminas. O material foi desparafinado em xilol durante 15 min e desidratado em concentrações crescentes de etanol, até a concentração final de 70%. Após este processo, as lâminas foram lavadas exaustivamente com água destilada para que se remova qualquer resquício de etanol. Posteriormente, cada lâmina foi corada em hematoxilina e eosina (HE). As lâminas coradas foram levadas ao microscópio óptico para avaliação dos parâmetros histomorfológicos, que seguiram o procedimento descrito por Laine e Weinstein (1988) para análise das amostras.

As seções foram avaliadas em um “estudo cego” (sem conhecimento dos tratamentos anteriores) por um patologista experiente. Resumidamente, foram examinamos seções de 1 cm de comprimento de amostra para: perda de células epiteliais (pontuação de 0-3), edema na mucosa superior (um escore de 0-4), lesão hemorrágica (pontuação de 0-4) e presença de células inflamatórias (pontuação de 0-3).

3.13.2 Quantificação dos níveis de hemoglobina na mucosa gástrica

Para quantificação dos níveis de hemoglobina (a qual indica hemorragia) foi utilizado o método colorimétrico (LABTEST[®], Diagnostic SA, Minas Gerais, Brasil).

As amostras de estômago foram homogeneizadas em reagente de cor (1 mL/100 mg de tecido), centrifugadas a 10000 rpm/10 min. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos e filtrados utilizando um filtro de 0,22 mm e centrifugados novamente a 10 000 rpm/10 min. A absorbância foi medida a 540 nm e a concentração de Hb foi expressa em mg de Hb/g de tecido.

3.13.3 Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) na mucosa gástrica

As concentrações de glutathiona reduzida (GSH) das amostras dos estômagos foram estimadas de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Um segmento do tecido gástrico foi homogeneizado em solução gelada de 0,02 M EDTA (1 mL/100 mg de tecido). Alíquotas de 400 µL de tecido homogêneo foram misturadas com 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (m/v) em tubos de vidro e centrifugados a 3000 rpm por 15 min. Em seguida, 400 µL de cada sobrenadante foi misturado com 800 µL de tampão Tris (0,4 M, pH 8,9) e 20 µL de 0,01 M 5,5-dinitro-bis (ácido 2-nitrobenzóico). Subsequentemente, as amostras foram agitadas por 3 min e realizada a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos como microgramas de GSH por grama de tecido.

3.13.4 Avaliação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica

Os níveis de MDA em cada grupo foram analisados usando o método descrito por Uchiyama e Mihara (1978). Esta metodologia se baseia na reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Fragmentos de tecidos com massa entre 100 e 150 mg foram homogeneizados com solução gelada de cloreto de potássio 1,15%. Resumidamente, 250 µL de cada amostra foram adicionadas a 1,5 mL de H₃PO₄ 1% e 0,5 mL de álcool terc-butílico 0,6% (solução aquosa). Essa mistura foi homogeneizada e aquecida em água fervente por 45 min e, então, resfriada imediatamente em água gelada seguida pela adição de 4 mL de n-butanol. Seguiu-se uma nova agitação e a camada de butanol retirada por centrifugação a 1200 x g por 10 min. A densidade óptica foi determinada em 535 e 520 nm, e as diferenças da densidade óptica entre as duas determinações foram calculadas com o valor do

álcool terc-butilíco. Os resultados foram expressos como nanomoles por grama de tecido (nmol/g).

3.13.5 Papel do óxido nítrico (NO) e do canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) na ação do PS-Pb sobre a mucosa gástrica

Um grupo experimental (n=6) foi pré-tratado com N(ω)-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (10 mg/kg, *i.p.*), um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), enquanto outro grupo experimental (n=6) foi pré-tratado com glibenclamida (10 mg/kg, *i.p.*), uma droga que bloqueia os canais K_{ATP} . Após 1 h do pré-tratamento com L-NAME e glibenclamida, foi administrado PS-Pb (3 mg/kg; *p.o.*) aos camundongos. Um terceiro grupo experimental (n=6) não recebeu nenhum pré-tratamento, somente foi administrado PS-Pb (3 mg/kg; *p.o.*). Após 30 min da administração de PS-Pb (3 mg/kg; *p.o.*) em todos os animais experimentais, as lesões gástricas foram induzidas por administração de etanol absoluto, como descrito na seção 3.13. Os grupos controles receberam somente solução salina ou salina + etanol.

3.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) para ensaios *in vitro* e como média \pm erro padrão da média (EPM) para ensaios *in vivo*. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls. Para as múltiplas comparações das análises histológicas, foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. O programa Prism 5.0[®] (GraphPad Software, San Diego, CA) foi usado para realizar as análises estatísticas. Diferenças foram consideradas significativas a partir de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Rendimento e composição do PS-Pb

O rendimento do polissacarídeo sulfatado obtido da alga *P. beachiae* seca através de extração enzimática com papaína foi de 7,5%. O conteúdo total de carboidrato no PS-Pb foi de 95,86% e somente traços de proteínas foram encontrados. A análise elementar, por sua vez, mostrou conteúdo de 31,86±0,23% e 2,30±0,23% para carbono e enxofre, respectivamente. Além disso, o grau de substituição para grupos sulfato (grau de sulfatação), por unidades dissacarídicas, foi calculado em 0,32 (Tabela 1).

Tabela 1. Análise bioquímica do polissacarídeo sulfatado obtido da alga vermelha *P. beachiae*

Amostra	Rendimento ^a (%)	Carboidratos ^b (%)	Enxofre ^c (%)	Carbono ^c (%)	Grau de sulfatação	Proteína ^d (%)
PS-Pb	7,5	95,86	2,30	31,86	0,32	-

^a obtido por extração enzimática com papaína

^b determinado pelo método de Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013)

^c determinado por microanálise elementar

^d determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976)

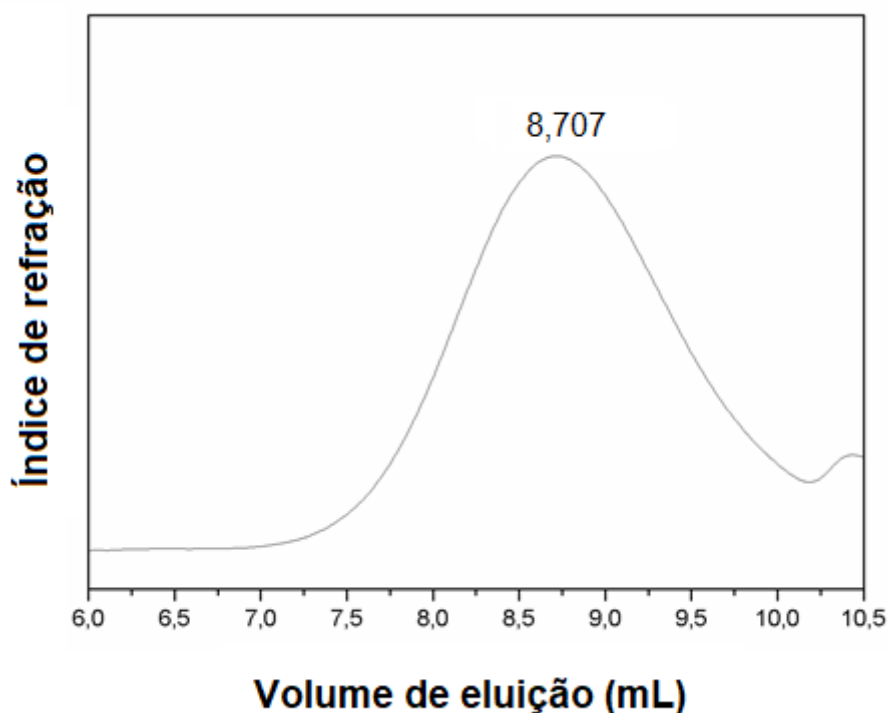
4.2 Massa molar do PS-Pb

A partir da curva de calibração do pululano, foi encontrada a equação do logaritmo da massa molar.

$$\text{Log } M_p = 14,6827 - 1,06967 \text{ Volume de eluição } (V_e) \quad (6)$$

Com base na equação 6, foi obtido um coeficiente de correlação linear de 0,99254. O cromatograma mostrou um pico único e amplo em 8,707 mL, como mostrado na Fig. 8, indicando uma distribuição de massa molar polidispersiva. Assim, a massa molar do PS-Pb foi estimada em $2,33 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

Fig. 8. Cromatograma (GPC) para PS-Pb.



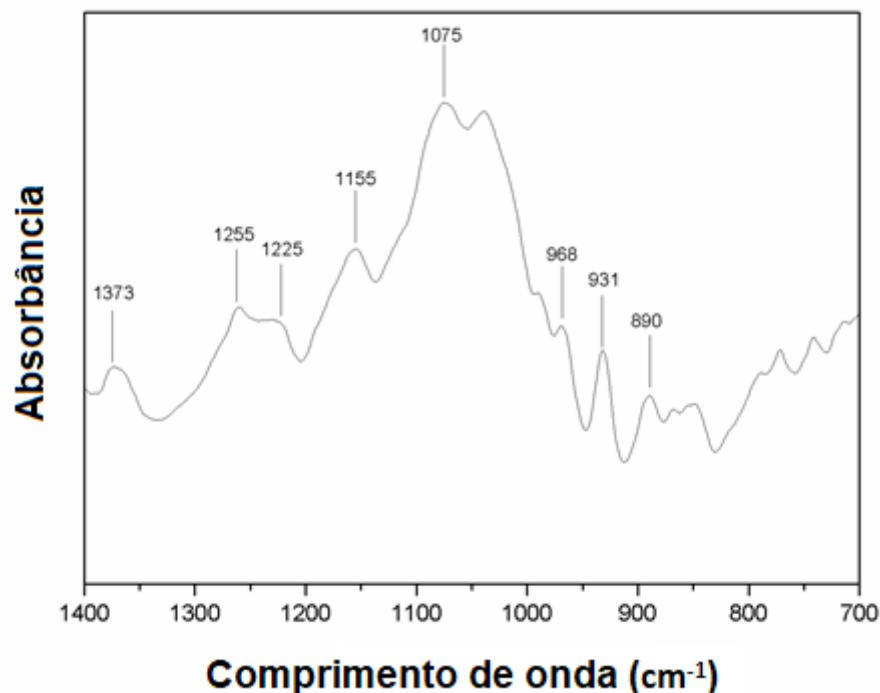
Fonte: Autor.

4.3 Caracterização do PS-Pb por espectroscopia

4.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) mostrou bandas em regiões características de ágar, tais como, 1255, 1075, 931 and 890 cm^{-1} . Já as bandas em 1373 cm^{-1} e 1255 cm^{-1} correspondem a ésteres de grupos sulfatos, enquanto que o ombro mostrado em 968 cm^{-1} denota a presença de ligações glicosídicas. Por fim, a banda em 1155 cm^{-1} representa um alongamento de C-O-C (Fig. 9).

Fig. 9. Espectro de IVTF do PS-Pb.



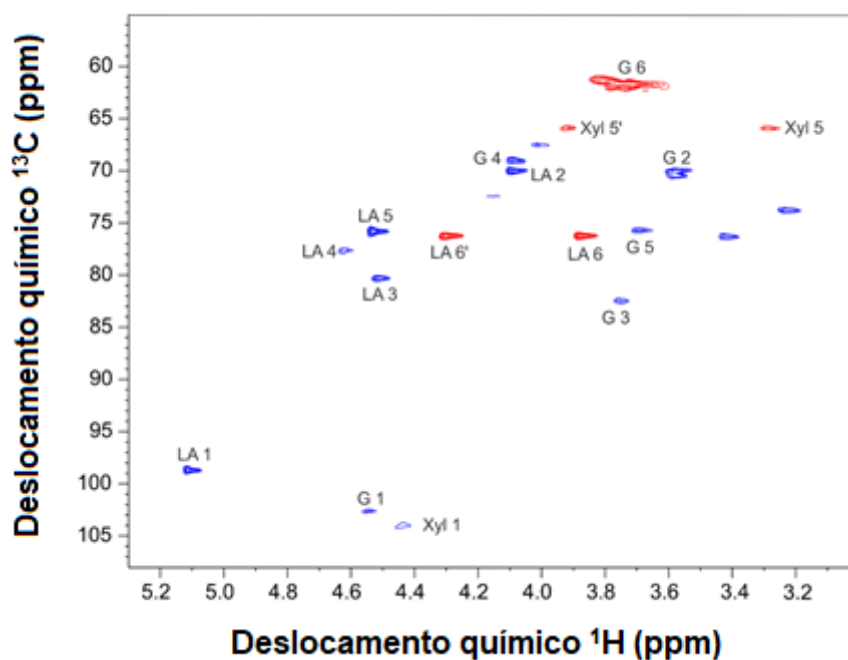
Fonte: Autor.

4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O espectro de HSQC (Fig. 10) mostra assinalamentos típicos de um polissacarídeo sulfatado do tipo ágar. Os sinais em δ 4.54/102.7 (H-1/C-1), δ 3.57/70.0 (H-2/C-2), 3.75/82.5 (H-3/C-3), 4.08/69.0 (H-4/C-4), 3.69/75.7 (H-5/C-5), 3.73/61.7 (H-6/C-6) ppm e em δ 5.10/98.7 (H-1/C-1), 4.08/70.1 (H-2/C-2), 4.50/80.3 (H-3/C-3), 4.62/77.6 (H-4/C-4), 4.52/75.8 (H-5/C-5), 4.32-3.90/76.0 (H-6/C-6) ppm, como vistos na tabela 2, são atribuídos a β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, respectivamente. Um sinal adicional em δ 103,7/4,46 (H-1/C-1) ppm foi observado e atribuído como uma xilose.

Além destes sinais anoméricos compatíveis, todos os outros sinais foram confirmados por espectros bidimensionais de ^1H (Fig. 11).

Fig. 10. Espectro de HSQC do PS-Pb.



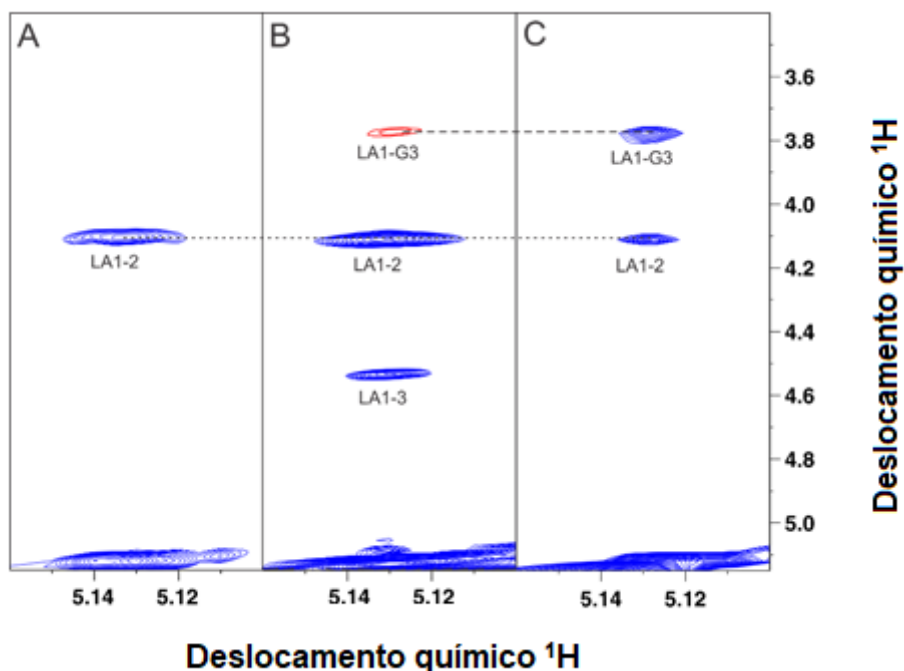
Fonte: Autor.

Tabela 2. Deslocamentos químicos (RMN) de ^1H and ^{13}C para PS-Pb

	β -D-galactopirranose (G)		3,6-anidro- α -L-galactopirranose (LA)	
	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	4,54	102,7	5,10	98,7
2	3,57	70,0	4,08	70,1
3	3,75	82,5	4,50	80,3
4	4,08	69,0	4,62	77,6
5	3,69	75,7	4,52	75,8
6	3,73	61,7	4,32/3,90	76,0

Fonte: Autor.

Fig. 11. Espectros bidimensionais de ^1H de PS-Pb. A) COSY; B) FASE-TOCSY; C) NOESY.



Fonte: Autor.

4.4 Atividade antioxidante *in vitro* do PS-Pb

A atividade antioxidante do PS-Pb foi avaliada em quatro ensaios *in vitro*, sequestro de radicais DPPH e hidroxila, quelação de íons ferrosos e redução do molibdênio.

O sequestro de radicais DPPH (Fig. 12A) mostrou uma atividade de sequestro crescente do PS-Pb, atingindo o pico da ação antioxidante na concentração de 4 mg/mL. Nesta concentração, o PS-Pb interagiu e inativou 62,14% dos íons DPPH em relação ao efeito do BHT (na concentração de 2,0 mg/mL), o qual foi usado como controle no experimento.

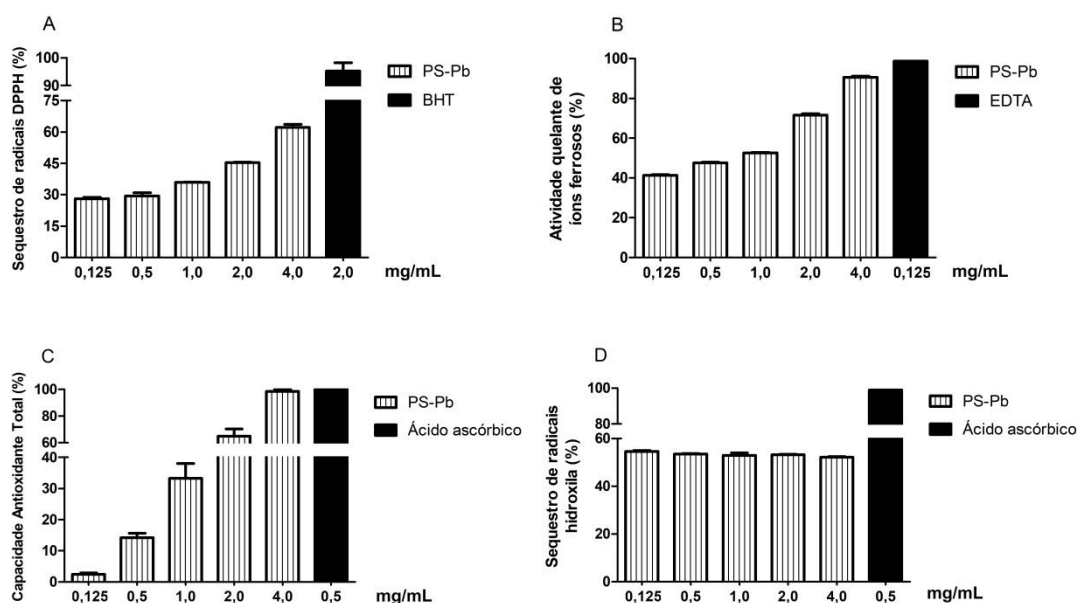
Em relação a atividade de quelação de íons ferrosos, o PS-Pb mostrou um de seus melhores efeitos antioxidantes, como visto na Fig. 12B. Após uma atividade de quelação crescente, na maior concentração avaliada (4 mg/mL) o PS-Pb atingiu um efeito 90,64% igual ao controle usado no teste, o agente quelante EDTA (0,125 mg/mL).

No teste realizado para determinar sua capacidade de redução, o PS-Pb apresentou o melhor resultado da série de quatro ensaios antioxidantes realizados (Fig. 12C). Na concentração máxima avaliada (4 mg/mL), o PS-Pb foi tão eficaz em reduzir o molibdato (VI) a molibdato (V) quanto o controle utilizado, ácido ascórbico (0,5 mg/mL).

Por fim, no ensaio de sequestro de radicais hidroxila, (Fig. 12D), a atividade do PS-Pb se manteve estável em todas as concentrações usadas. No entanto, o efeito obtido, em torno de 52% da atividade do ácido ascórbico (0,5 mg/mL), é considerado relevante, uma vez que o radical hidroxila é altamente reativo e de difícil neutralização.

Todos os compostos-controle utilizados nos ensaios foram avaliados com as mesmas concentrações do PS-Pb (0,125 – 4 mg/mL). Nos gráficos, no entanto, é mostrado somente a menor concentração a obter efeito antioxidante máximo.

Fig. 12. Atividade antioxidante *in vitro* do PS-Pb. A) sequestro do radical DPPH; B) quelação de íons ferrosos; C) capacidade antioxidante total; D) sequestro de radicais hidroxila. Média \pm DP.

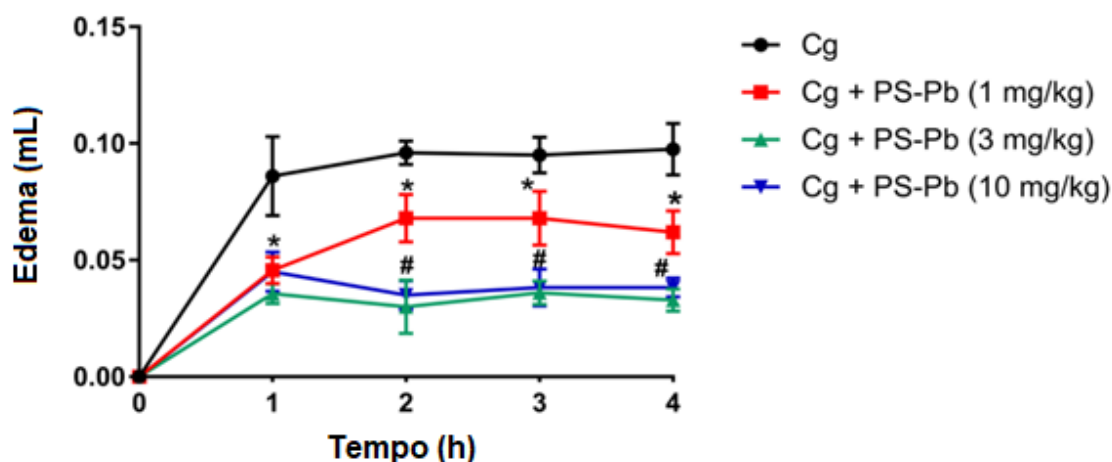


Fonte: Autor.

4.5 Efeito anti-inflamatório do PS-Pb no edema de pata induzido por carragenina

Uma hora após administração de carragenina, todos os grupos previamente tratados com PS-Pb (1, 3 e 10 mg/kg) apresentaram edema de pata significativamente ($p < 0,05$) menor que o mostrado pelo grupo carragenina (sem pré-tratamento). A diferença se manteve significativa entre o grupo carragenina e os grupos pré-tratados após duas horas da indução do edema de pata por carragenina. O grupo PS-Pb 1 mg/kg apresentou, ainda, edema de pata significativamente ($p < 0,05$) maior em relação aos demais grupos pré-tratados com PS-Pb (3 e 10 mg/kg). Nas últimas avaliações, terceira e quarta horas após indução do edema, as diferenças entre os grupos se mantiveram. O pré-tratamento com PS-Pb 1 mg/kg foi suficiente para reduzir de forma significativa ($p < 0,05$) o edema de pata apresentado pelo grupo carragenina, enquanto que as doses 3 e 10 mg/kg de PS-Pb mostraram redução significativa ($p < 0,05$) do edema de pata em relação ao grupo PS-Pb 1 mg/kg. Em nenhuma avaliação ao longo do teste houve diferença significativa entre os grupos PS-Pb 3 e 10 mg/kg. (Fig. 13).

Fig. 13. Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (1, 3 e 10 mg/kg; *i.p.*) no edema de pata induzido por carragenina. Média \pm EPM (n=6). * $p < 0,05$ vs. carragenina; # $p < 0,05$ vs. PS-Pb 1 mg/kg. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).



Fonte: Autor.

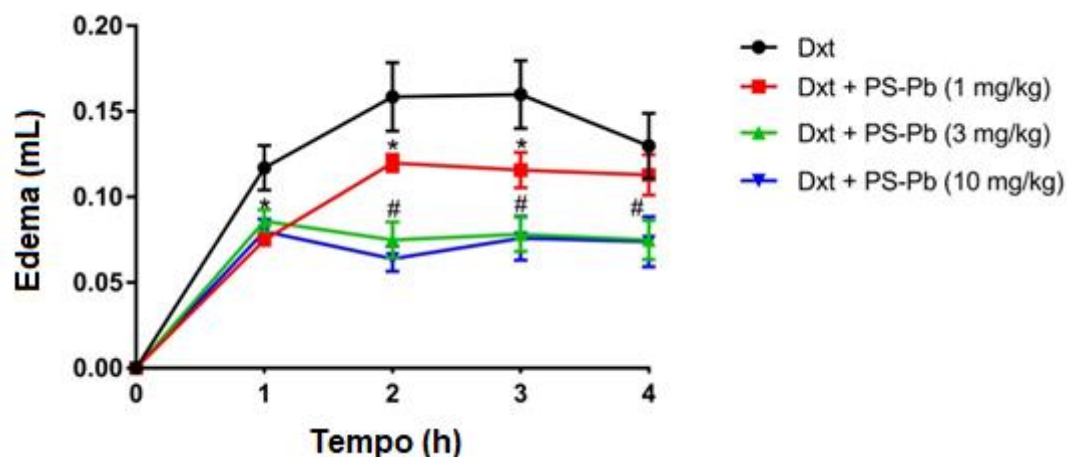
4.6 Efeito anti-inflamatório do PS-Pb no edema de pata induzido por dextrana

Em relação a administração do agente flogístico dextrana, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo dextrana (sem nenhum tipo de pré-tratamento) e os três grupos que foram pré-tratados com PS-Pb uma hora após indução do edema de pata. Na segunda avaliação, duas horas após injeção de dextrana, a diferença entre o grupo dextrana e os grupos pré-tratados com PS-Pb se manteve significativa. Ainda na segunda avaliação, foi observado que o edema de pata do grupo PS-Pb 1 mg/kg foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que os dos grupos PS-Pb 3 e 10 mg/kg.

Essa tendência se manteve na terceira hora pós-indução. O PS-Pb 1 mg/kg com diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo dextrana e os grupos PS-Pb 3 e 10 mg/kg com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo PS-Pb 1 mg/kg. Na quarta hora, última avaliação, o edema do grupo dextrana diminuiu aos mesmos níveis do grupo PS-Pb 1 mg/kg, criando assim uma igualdade estatística entre os grupos.

A diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos PS-Pb 3 e 10 mg/kg e o grupo PS-Pb 1 mg/kg, no entanto, foi mantida. Assim como nos testes usando carragenina, não houve em nenhum dos quatro momentos de avaliação, diferença significativa entre os grupos que usaram PS-Pb nas doses de 3 e 10 mg/kg. Sendo assim, a dose de 3 mg/kg foi escolhida para experimentos posteriores que buscaram elucidar o mecanismo de ação anti-inflamatório do PS-Pb. Todos os resultados são vistos na Fig. 14.

Fig. 14. Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (1, 3 e 10 mg/kg; *i.p.*) no edema de pata induzido por dextrana. Média \pm EPM (n=6). * $p < 0,05$ vs. dextrana; # $p < 0,05$ vs. PS-Pb 1 mg/kg. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).



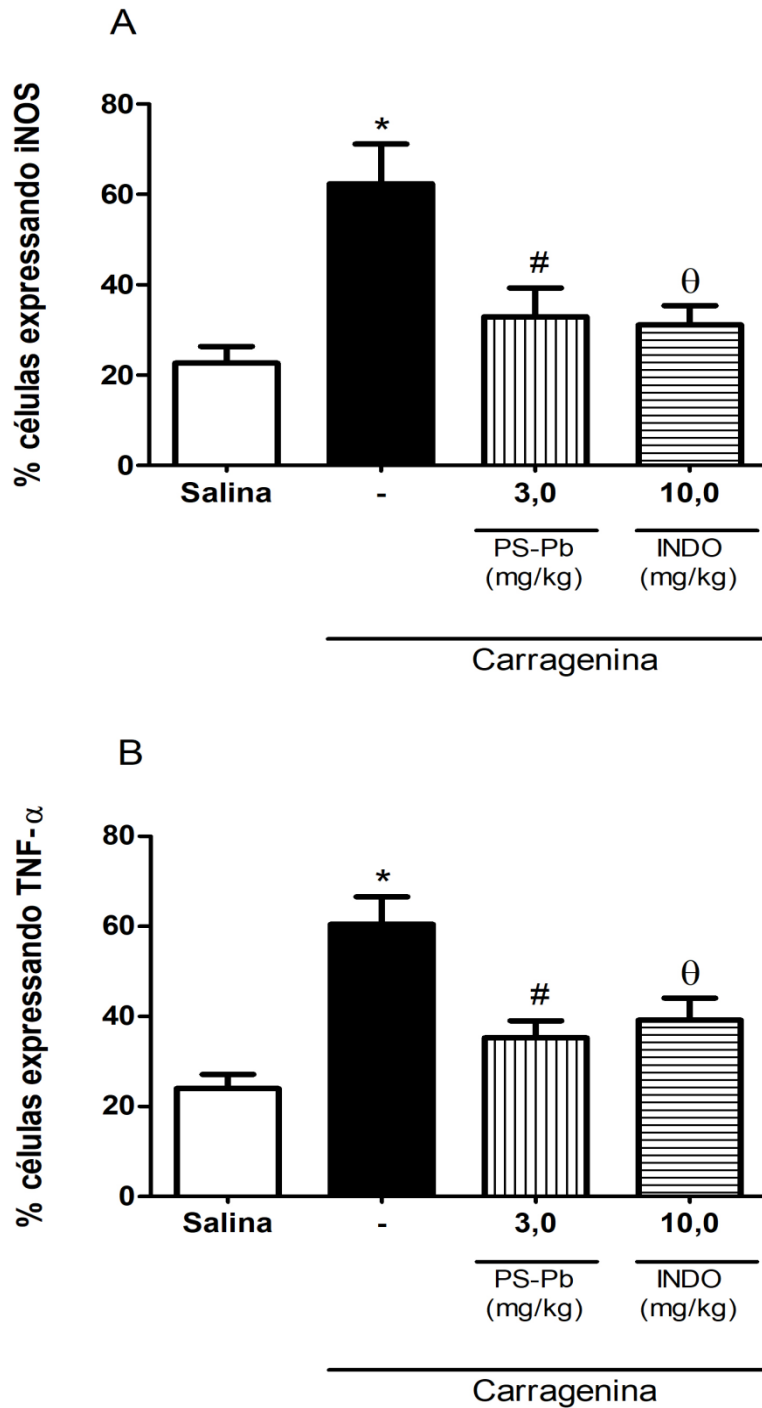
Fonte: Autor.

4.7 Efeito do PS-Pb na imunoexpressão de iNOS e TNF- α em patas com edema induzido por carragenina

O pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a porcentagem de células que expressaram o antígeno para iNOS, quando comparado ao grupo carragenina. O mesmo resultado estatístico ($p < 0,05$) foi alcançado pela administração da droga padrão indometacina (10 mg/kg), na comparação ao grupo carragenina. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos salina, PS-Pb e indometacina (Fig. 15A e 16A).

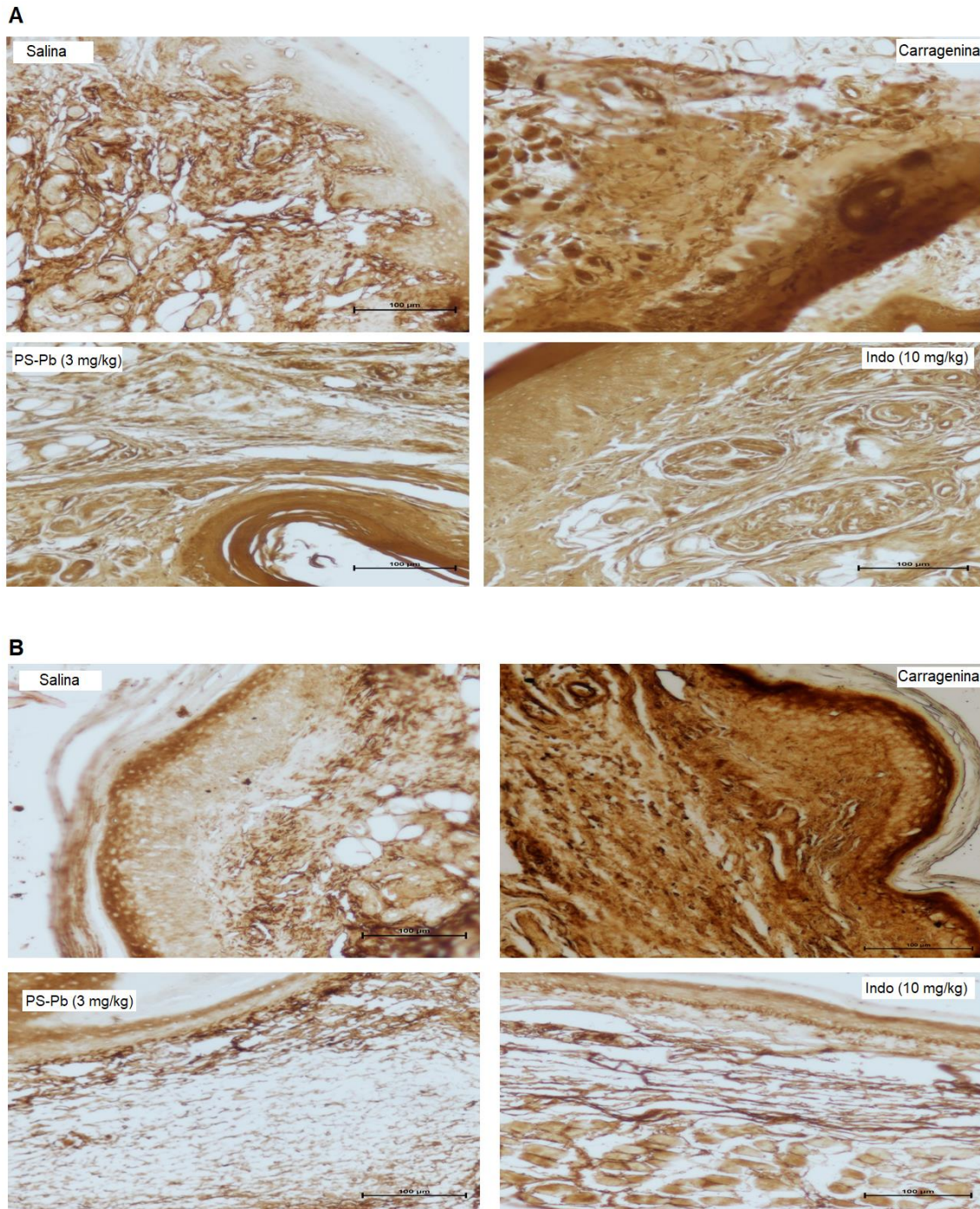
Da mesma forma, o pré-tratamento com PS-Pb na dose de 3 mg/kg também reduziu significativamente ($p < 0,05$) a porcentagem de células que expressam o antígeno para o TNF- α . O medicamento padrão indometacina (10 mg/kg) obteve o mesmo resultado estatístico ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina. Houve igualdade estatística entre os grupos salina, PS-Pb e indometacina (Fig. 15B e 16B).

Fig. 15. Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg; *i.p.*) sobre a expressão imunohistoquímica de iNOS e TNF- α em patas com edema induzido por carragenina. Média \pm EPM (n=6). * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs. carragenina; θ $p < 0,05$ vs. carragenina. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).



Fonte: Autor.

Fig. 16. Mensuração da densidade óptica para A) iNOS e B) TNF- α em patas de camundongos com edema induzido por carragenina. Os animais foram pré-tratados com PS-Pb (3 mg/kg; *i.p.*), salina ou indometacina (10 mg/kg; *i.p.*) (400x).

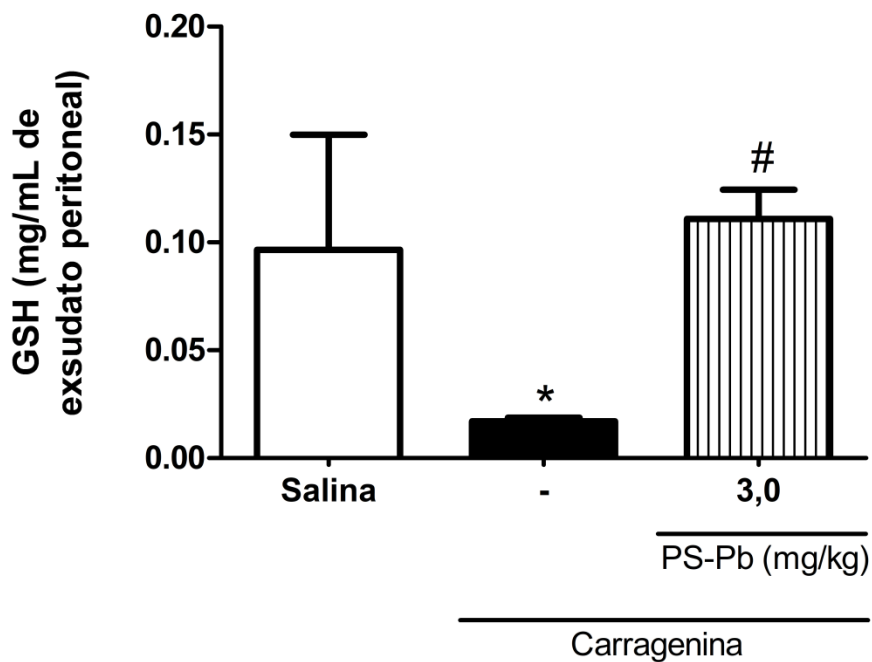


Fonte: Autor.

4.8 Efeito do PS-Pb nos níveis de GSH do exsudato peritoneal após peritonite induzida por carragenina

Como mostrado na Fig. 17, os animais que receberam injeção (*i.p.*) de carragenina tiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de GSH encontrados no exsudato peritoneal, quando comparados aos animais do grupo controle, que receberam somente salina (*i.p.*). O pré-tratamento com PS-Pb na dose de 3 mg/kg impediu a depleção de GSH provocada pela carragenina, como visto na comparação entre os grupos PS-Pb (3 mg/kg) e carragenina ($p < 0,05$). Desta forma, houve igualdade estatística entre os grupos PS-Pb (3 mg/kg) e controle (salina).

Fig. 17. Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg; *i.p.*) sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal após peritonite induzida por carragenina. Média \pm EPM (n=6). * $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,05$ vs. carragenina. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

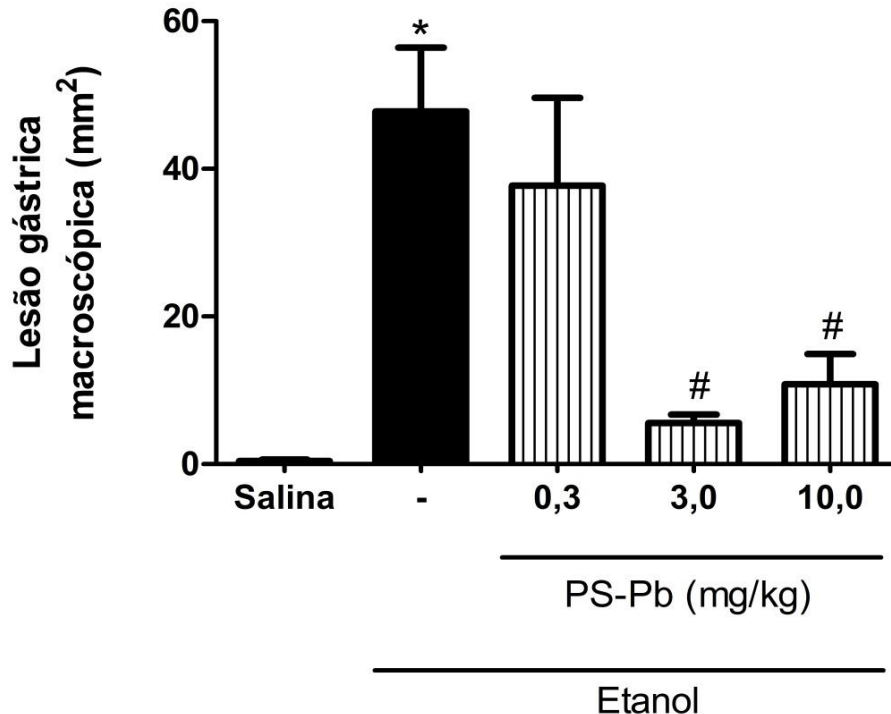


Fonte: Autor.

4.9 Atividade gastroprotetora do PS-Pb na lesão gástrica induzida por etanol

Como demonstrado na Fig. 18, o PS-Pb diminuiu significativamente ($p < 0,01$), nas doses de 3 e 10 mg/kg, a lesão gástrica causada pelo etanol. A dose de 0,3 mg/kg de PS-Pb foi insuficiente para reduzir estatisticamente a área de lesão. Não houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com PS-Pb (nas doses de 3 e 10 mg/kg) e o grupo controle (tratado somente com salina e sem a indução de ulcerações por etanol). Também não houve diferença significativa na comparação entre os grupos pré-tratados com PS-Pb nas doses de 3 e 10 mg/kg. Desse forma, foi escolhida a menor dose com efeito terapêutico (3 mg/kg) para os experimentos posteriores que buscaram esclarecer o mecanismo de ação do PS-Pb na gastroproteção.

Fig. 18. Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (0,3, 3 e 10 mg/kg; *p.o.*) sobre a lesão gástrica induzida por etanol em camundongos. Média \pm EPM (n=6). * $p < 0,001$ vs. salina; # $p < 0,01$ vs. etanol. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

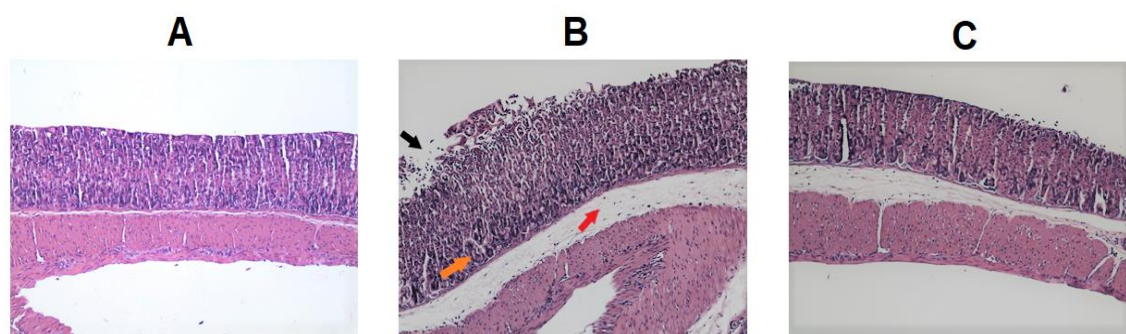


Fonte: Autor.

4.10 Efeito gastroprotetor do PS-Pb na lesão gástrica microscópica

A administração de etanol absoluto induziu dano microscópico à mucosa gástrica, o qual foi caracterizado por perturbação e descontinuidade da região glandular gástrica superficial com intensa perda celular epitelial, edema submucoso e hemorragia. O pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg), no entanto, foi eficaz em prevenir significativamente ($p < 0,05$) a mucosa gástrica dos efeitos deletérios causados pelo etanol, como visto ilustrativamente na Fig. 19. Os resultados quantitativos dessas avaliações são mostrados na tabela 3.

Fig. 19. Efeito do pré-tratamento com PS-Pb sobre o dano histológico da mucosa gástrica (Microfotografia). A) Grupo salina; B) Grupo etanol, mostrando perturbação e descontinuidade da região glandular gástrica superficial com intensa perda celular epitelial (seta preta), edema submucoso (seta vermelha) e hemorragia (seta laranja); C) PS-Pb (3 mg/kg) + etanol absoluto, mostrando preservação da mucosa gástrica (100x).



Fonte: Autor.

Tabela 3. Efeito do PS-Pb (3 mg/kg) na lesão gástrica microscópica induzido por etanol

Grupo Experimental	Edema (0-4)	Hemorragia (0-4)	Perda de células epiteliais (0-3)	Células inflamatórias (0-3)	Total (0-14)
Salina	0 (0-1)	1 (0-1)	0 (0-1)	0	1 (0-1)
Etanol	3 (2-4)*	4 (2-4)*	3 (2-3)*	0	10 (0-11)*
PS-Pb	1 (1-2)#	2 (0-4)#	1 (1-2)#	0	4 (0-8)#

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salina.

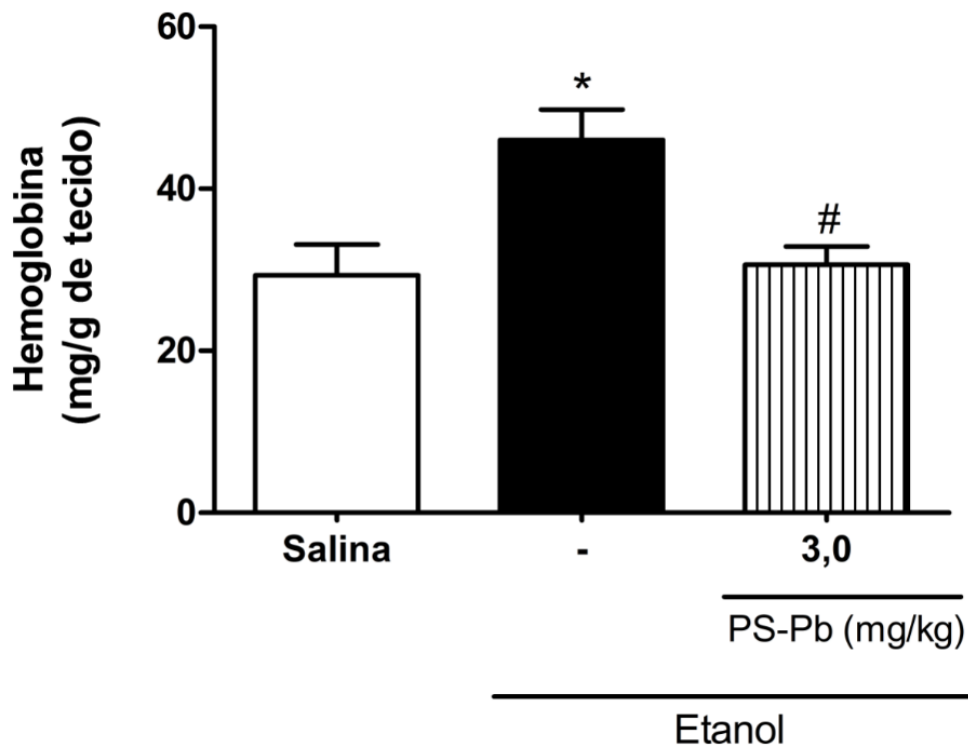
$p < 0,05$ quando comparado ao grupo etanol.

4.11 Ação do PS-Pb sobre os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica

Os níveis de hemoglobina na mucosa gástrica estavam significativamente mais elevados ($p < 0,05$) no grupo que recebeu etanol absoluto sem qualquer tipo de pré-tratamento, quando comparado ao grupo controle (salina). O pré-tratamento com PS-Pb, na dose de 3 mg/kg, obteve êxito ao impedir o dano hemorrágico provocado pelo etanol, como evidenciado na diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos etanol e PS-Pb.

Assim sendo, houve igualdade estatística entre os grupos PS-Pb e controle, como evidenciado na Fig. 20.

Fig. 20. Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg; *p.o.*) de PS-Pb sobre o dano hemorrágico da mucosa gástrica em camundongos tratados com etanol. Média \pm EPM (n=6). * $p < 0,05$ vs. salina; # $p < 0,05$ vs. etanol. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).



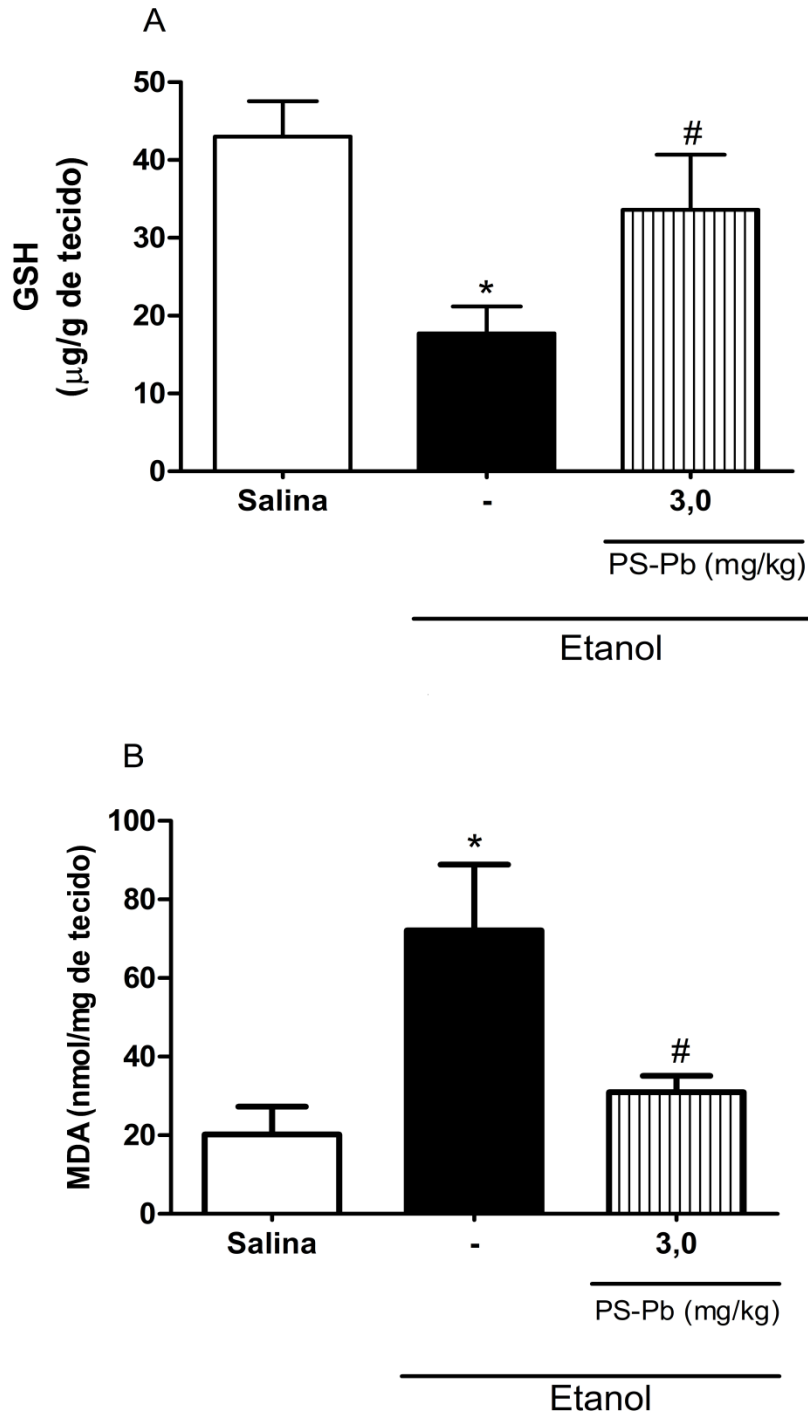
Fonte: Autor.

4.12 Ação do PS-Pb sobre o estresse oxidativo na mucosa gástrica

Os resultados demonstraram que nos animais que receberam apenas etanol absoluto, os níveis de GSH encontrados no estômago foram significativamente ($p < 0,05$) menores que os encontrados no grupo controle (tratado somente com solução salina). No entanto, o pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg) preveniu significativamente ($p < 0,05$) a redução dos níveis de GSH na mucosa gástrica causada pelo etanol. Conseqüentemente, os grupos controle e PS-Pb foram estatisticamente iguais, como visto na Fig. 21A.

Os animais que receberam somente etanol absoluto apresentaram concentrações de MDA no estômago significativamente superiores ($p < 0,05$) aquelas encontradas no grupo controle. O aumento nos níveis de MDA, no entanto, foi prevenido ($p < 0,05$) pelo pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg). Desta forma, não houve diferença estatística na comparação entre os grupos controle e PS-Pb. Fig. 21B.

Fig. 21. Efeito do pré-tratamento com PS-Pb (3 mg/kg; *p.o.*) sobre o dano oxidativo da mucosa gástrica em camundongos tratados com etanol. A) níveis de GSH; B) concentração de MDA. Média \pm EPM (n=6). * $p < 0,05$ vs. salina; # $p < 0,05$ vs. etanol. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).



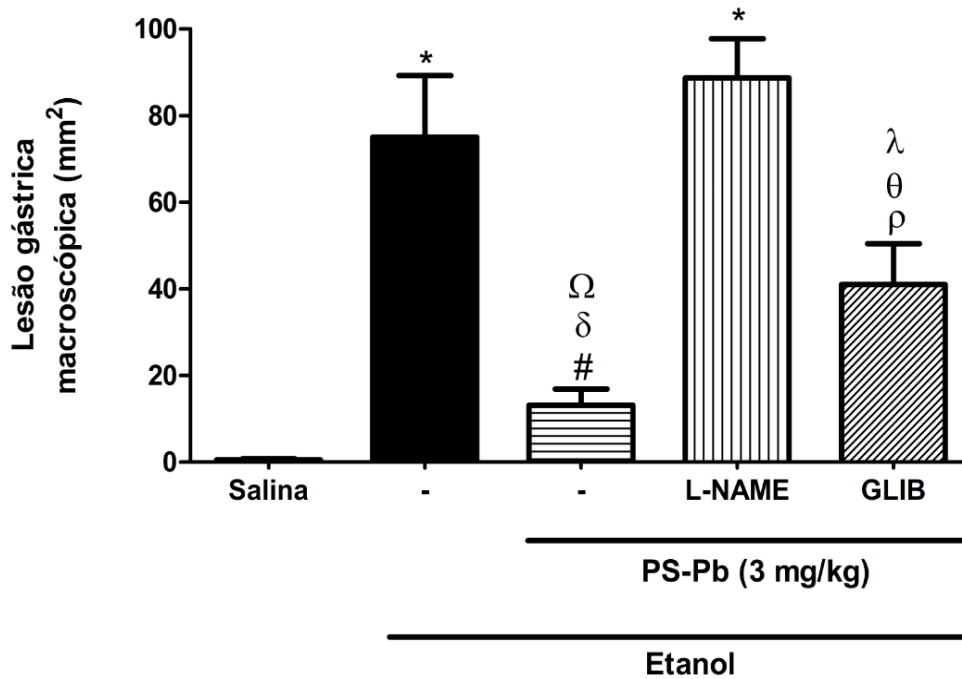
Fonte: Autor.

4.13 Papel do óxido nítrico e do canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) no efeito gastroprotetor do PS-Pb

A Fig. 22 mostra o resultado do pré-tratamento de PS-Pb sobre a lesão gástrica concomitante ao uso de dois moduladores, L-NAME e glibenclamida. O grupo pré-tratado somente com PS-Pb (dose de 3 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,001$) a ulceração gástrica evocada pelo etanol, assim como o grupo pré-tratado com PS-Pb + glibenclamida, entretanto, apesar de significativo, o efeito terapêutico alcançado por este grupo foi de menor proporção ($p < 0,05$) na comparação com o grupo etanol. Esta diferença de magnitude é evidenciada na comparação entre os grupos PS-Pb e PS-Pb + glibenclamida ($p < 0,05$).

Já o advento do uso de L-NAME, ao pré-tratamento com PS-Pb, mostrou-se um fator determinante para impedir a proteção da mucosa gástrica ante os efeitos ulcerativos provocados pelo etanol. Desta forma, a comparação de área ulcerada entre os grupos PS-Pb e PS-Pb + L-NAME mostra uma diferença significativa ($p < 0,001$). Houve também diferença entre os grupos PS-Pb + glibenclamida e PS-Pb + L-NAME ($p < 0,05$).

Fig. 22. Avaliação do envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e do canal de potássio sensível a ATP (K_{ATP}) no efeito terapêutico do PS-Pb (3 mg/kg) sobre a lesão gástrica induzida por etanol. Os bloqueadores L-NAME e glibenclamida foram utilizados. Média \pm EPM (n=6). * $p < 0,001$ vs. salina; ρ $p < 0,05$ vs. salina; # $p < 0,001$ vs. etanol; θ $p < 0,05$ vs. etanol; $\delta < 0,001$ vs. PS-Pb + L-NAME; λ $p < 0,05$ vs. PS-Pb + L-NAME; Ω $p < 0,05$ vs. PS-Pb + glibenclamida. (One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).



Fonte: Autor.

5 DISCUSSÃO

Não há relatos anteriores sobre a extração enzimática de polissacarídeos sulfatados de qualquer alga marinha do gênero *Pterocladia*, entretanto o rendimento obtido neste estudo com a espécie *P. beachiae* (7,5%) é considerado aceitável para um composto com potencial farmacológico.

Algas marinhas de outros gêneros apresentam grande variação na produção de polissacarídeos sulfatados, como visto na comparação entre a *Hypnea musciformis*, cuja recuperação obtida foi de 31,8% (BRITO et al., 2016) e a *Champia feldmannii*, com recuperação de somente 3,62% de polissacarídeos sulfatados (LINS et al., 2009). A recuperação de polissacarídeos sulfatados, entretanto, pode variar fortemente até dentro do mesmo gênero. Espécies do gênero *Gracilaria*, por exemplo, as quais fornecem cerca de 60% do ágar bruto para os diversos usos industriais (VERGARA-RODARTE et al., 2010), têm rendimentos que variam de 4,66%, obtidos de *Gracilaria birdiae* (VANDERLEI et al., 2011), até 36,7% de polissacarídeos sulfatados recuperados, obtidos a partir de *Gracilaria intermedia* (LEÓDIDO et al., 2017).

O grande teor de carboidratos e a ínfima quantidade de proteínas contaminantes encontradas no PS-Pb evidenciam a eficácia do método de extração enzimática utilizando papaína, principalmente na quantidade de proteínas presentes na amostra, quando comparada a outras metodologias, como a extração aquosa, tanto a temperatura quente, quanto a fria. Uma extração de *Gracilaria caudata* sob condições de aquecimento, por exemplo, obteve uma amostra de polissacarídeo sulfatado com 8,75% de proteínas contaminantes (BARROS et al., 2013), enquanto uma extração aquosa fria de *Gracilaria birdiae* mostrou 7,60% de proteínas no polissacarídeo sulfatado bruto (MACIEL et al., 2008).

Quanto ao grau de sulfatação, o resultado obtido é o primeiro indicativo de que o PS-Pb é de fato uma galactana do tipo ágar. Um baixo grau de sulfatação é comum em espécies produtoras de ágar, como visto nas espécies *G. caudata* (BARROS et al., 2013) e *Bryothamnion triquetrum* (RIBEIRO, 2016), cujo grau de sulfatação foi 0,13 e 0,28, respectivamente.

O PS-Pb apresentou ainda uma alta massa molar, superior a $2,0 \times 10^5$ g mol⁻¹, o que é uma constante para muitos polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas e ocorre devido ao agrupamento de cadeias polissacarídicas (POMIN et

al., 2010). As altas massas molares são comuns tanto em ágar quanto em carragenana, como demonstrado por Bouhlal et al. (2011), que determinaram a massa molar média do polissacarídeo sulfatado de ágar de *Boergeseniella thuyoides* em $3,6 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, e por Zhou et al. (2004), que obtiveram uma λ -carragenana de *Chondrus ocellatus* com massa molar de aproximadamente $6,5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

Após os primeiros experimentos revelarem a caracterização inicial e a composição do PS-Pb, técnicas de espectroscopia foram usadas no intuito de elucidar e classificar sua estrutura química.

O espectro de IVTF mostrou bandas que são largamente reconhecidas na literatura (BOUHLAL et al., 2011; CHRISTIAEN & BODARD, 1983) como típicas de polissacarídeos sulfatados do tipo ágar, em 1255, 1075, 931 e 890 cm^{-1} . A sulfatação foi confirmada pelo IVTF através das bandas em 1373 cm^{-1} e 1255 cm^{-1} , assim como pelo ombro em 1225 cm^{-1} , todos correspondendo a grupos de éster sulfato (ROCHAS, LAHAYE, YAPHE, 1986; RUPÉREZ, AHRAZEM, LEAL, 2002; SOUZA et al., 2012; ZHANG et al., 2004). A banda vista em 1155 cm^{-1} , corresponde ao estiramento assimétrico do C-O-C (DANIAL et al., 2015; GONZAGA et al., 2005) e o pico na região em torno de 1075 cm^{-1} representa o esqueleto de uma galactana (CIAN et al., 2014; SEKKAL & LEGRAND, 1993). Por fim, um pequeno ombro na região entre $970\text{-}965 \text{ cm}^{-1}$ indica a presença de ligações glicosídicas (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKKAL & LEGRAND, 1993).

O espectro também apresentou um pico em 931 cm^{-1} indicando a presença do grupo C-O-C de 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose (3,6-AnGal) (DUARTE et al., 2002; McCANDLESS; WEST; GUIRY, 1983; PEREIRA et al., 2009) e uma banda em 890 cm^{-1} , a qual é característica do ágar (BOUHLAL et al., 2011; CIAN et al., 2014). Por fim, a ausência da banda em 827 cm^{-1} indica a inexistência de 6-sulfato- α -L-galactose, o precursor biológico do 3,6-AnGal (MAZUMDER et al., 2002; REES, 1961).

A região de diagnóstico ($940\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$), também conhecida como região anomérica ou *fingerprint*, é crítica para o reconhecimento de ágares. Alguns picos são comuns a ágares e carragenanas, como a faixa em 931 cm^{-1} associada aos resíduos 3,6-anidro-galactopiranoose, observada em todos os espectros, no entanto, na região diagnóstica, a faixa de 890 cm^{-1} é um forte indicador de ágar. Esta banda foi encontrada apenas uma vez em espécies de κ -carragenana (ARMAN & QADER, 2012) e está ausente em λ e ι carragenana, correspondendo a um anel piranosil não

sulfatado encontrado em ágar (MATSUHIRO & RIVAS, 1993; MOLLION; ANDRIANTSIFERANA; SEKKAL, 1990; WHYTE; HOSFORD; ENGLAR, 1985). Assim, o espectro de IVTF confirma o PS-Pb como uma galactana do tipo ágar.

Os sinais anoméricos vistos na tabela 2 são atribuídos à β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, respectivamente, como previamente mencionado por Barros et al. (2013). Além da comprovação de um polissacarídeo sulfatado do tipo ágar, os resultados da RMN mostraram a presença de xilose no HSQC, dado que corrobora com o estudo de Errea e Matulewicz (2003), que revelou o gênero *Pterocliadiella* como produtor de xilose, tendo este carboidrato ligado à sua estrutura como um substituinte.

Como mencionado anteriormente neste estudo, para um polissacarídeo sulfatado do tipo galactana ser classificado como ágar, idealmente ele deve ser composto de resíduos de D-galactopiranosose e L-galactopiranosose ligados por ligações (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4) (SUDHARSAN et al., 2018). Assim, para confirmar este tipo de ligação, realizaram-se experimentos de espectroscopia bidimensional ^1H , tais como COSY, FASE-TOCSY e NOESY. No experimento COSY, foram observados acoplamentos escalares (J); no experimento FASE-TOCSY, foi observado acoplamento escalar e acoplamento dipolo anti-fase; enquanto que o espectro NOESY mostrou um acoplamento dipolo.

O espectro COSY apresentou a região dos anoméricos da 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, na qual foi observada apenas uma correlação, entre H1-H2, o que pode ser confirmado nos outros dois espectros. No espectro de FASE-TOCSY, um sinal anti-fase a δ 3,75 ppm sugere um acoplamento de dipolo com o 3H do resíduo β -D-galactopiranosose, que foi confirmado por NOESY. O acoplamento na região anomérica da 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose não foi observado devido à sobreposição de sinais com a diagonal, porém, em concordância com esses dados, é possível inferir que esta molécula possui um esqueleto de ágar.

Uma vez que diversos trabalhos feitos pelo nosso grupo de pesquisa (ALENCAR et al., 2019; CASTRO et al., 2018; SOUSA et al., 2016), mostraram ação antioxidante satisfatória de polissacarídeos sulfatados extraídos de algas vermelhas, testes para determinar a atividade antioxidante do PS-Pb foram realizados.

O DPPH é um radical de nitrogênio estável amplamente utilizado para medir a capacidade de remoção de radicais livres de compostos antioxidantes em potencial (HU et al., 2010; LI et al., 2015). Este radical é menos reativo do que os

radicais peroxila devido à sua inacessibilidade estérica em torno do átomo de nitrogênio, que fica protegido de muitos agentes antioxidantes. No entanto, o DPPH pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável (FOTI, 2015; NOMURA et al., 1997; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Estudos recentes demonstram a eficácia de polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas, tais como, *Acanthophora spicifera*, *Gracilaria birdiae* e *Porphyra haitanensis* em reduzir DPPH (ANAND et al., 2018; SOUZA et al., 2012; ZHANG et al., 2009). Os polissacarídeos sulfatados de *G. birdiae* e *P. haitanensis* são classificados como ágar, enquanto que a *A. spicifera* produz polissacarídeos sulfatados do tipo carragenana, o que corrobora com a ideia de que a estereoquímica do polissacarídeo sulfatado não afeta fundamentalmente sua atividade a atividade de sequestro de radicais, pelo menos não especificamente no caso do radical DPPH. Segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Mensor et al. (2001), a atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados está relacionada ao número de grupos hidroxila disponíveis e, conseqüentemente, à sua capacidade de doação de hidrogênio para reduzir o radical DPPH e torná-lo um elemento mais estável.

O ferro é um importante cofator em vários processos biológicos nas células vivas, tais como síntese de proteínas e DNA, transporte de oxigênio e metabolismo energético (DIAS et al., 2017; PANTOPOULOS et al., 2012). No entanto, o ferro é também o metal de transição mais deletério, atuando como um poderoso oxidante lipídico devido à sua alta reatividade. O estado ferroso do ferro é mais reativo que o estado férrico, produzindo radicais reativos, como o radical livre hidroxila, a partir de peróxidos de hidrogênio e lipídios por meio da reação de Fenton (GÜLÇİN, 2006; GUTTERIDGE, 1987).

Os dados relativos à eficiência quelante de íons ferrosos por polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas são conflitantes. Fidelis et al. (2014) relataram que os polissacarídeos sulfatados de *G. birdiae* não apresentaram efeito significativo em baixas concentrações (1 mg/mL) e uma resposta semelhante foi encontrada por Yang et al. (2011) com a alga vermelha *Corallina officinalis*. Entretanto, Costa et al. (2010) utilizando polissacarídeos sulfatados de *G. caudata*, um ágar, e Sokolova et al. (2011), com uma carragenana extraído da *Chondrus pinnulatus*, obtiveram resultados satisfatórios.

As carragenanas têm um teor de sulfato mais elevado por unidade de dissacarídeo do que os ágaros (LIANG et al., 2014), e estes grupos sulfato têm atividade nucleofílica. Assim, os resultados significativos alcançados por esse tipo de polissacarídeo sulfatado podem ser explicados por essa característica (GURPILHARES et al., 2016), no entanto, de acordo com Sokolova et al. (2011), a presença destes grupos funcionais e, conseqüentemente, de um maior grau de sulfatação não são os únicos fatores que possam afetar a capacidade quelante dos polissacarídeos sulfatados. Assim, a estrutura geral da galactana também deve ser considerada como um fator importante.

O molibdênio é um nutriente essencial encontrado tanto em animais quanto em plantas, onde atua como cofator nas enzimas redox, tais como xantina oxidase, aldeído oxidase e sulfito oxidase, no entanto, pode ser prejudicial em altas concentrações (BERTONI et al., 2015; KISKER, SCHINDELIN; REES, 1997). As fontes de molibdênio hexavalente solúvel (VI), como os compostos de molibdato de sódio, são mais tóxicas do que os compostos com menor estado de oxidação e insolúveis, como o molibdênio (V). O molibdênio (VI) é altamente consumido em países desenvolvidos e sua toxicidade ocorre por interferências na disponibilidade de cobre em sistemas biológicos, levando a várias complicações, como desordens de fertilidade (JAY MURRAY et al., 2014; TURNLUND & FRIBERG, 2007).

Diversos polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas demonstraram capacidade de atuar como doadores de elétrons, tais como *H. musciformis* (ALVES et al., 2012), *G. caudata* (COSTA et al., 2010) e *Solieria filiformis* (SOUSA et al., 2016). Estes resultados mostram que a estereoquímica não é um fator chave para reduzir molibdato (VI) a molibdato (V), uma vez que tanto ágaros quanto carragenanas demonstraram resultados expressivos neste ensaio. De fato, segundo Bertoni et al. (2018) e Prieto et al. (1999), a presença de grupos hidroxila livres é uma característica mais importante para moléculas com potencial redutor. Assim, é presumível que a capacidade antioxidante total de polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas seja associada à quantidade de extremidades redutores encontrados em sua cadeia.

O radical hidroxila é extremamente reativo e interage com a maioria das macromoléculas celulares, como os lipídios de membrana, levando à destruição das membranas celulares e de muitos componentes do DNA (CAROCHO & FERREIRA, 2013; COSTA et al., 2010; HU et al., 2010). Além disso, os radicais hidroxila também

podem reagir com carboidratos e ligações sulfidrilas em proteínas (CRAFT et al., 2012; MACHLIN & BENDICH, 1987).

Existem duas maneiras de neutralizar os radicais hidroxila: através da eliminação dos radicais já formados ou suprimindo sua geração (FLEITA; EL-SAYED; RIFAAT, 2015; UEDA et al., 1996). A via indireta de ação antioxidante ocorre quando se impede um metal, principalmente Fe^{2+} , de reagir com o H_2O_2 para produzir, através da reação de Fenton, radicais hidroxila (LÜ et al., 2010; PISOSCHI & POP, 2015).

Devido à sua alta reatividade, o radical hidroxila possui uma pequena capacidade de difusão, interagindo apenas com as biomoléculas adjacentes (D'AUTRÉAUX & TOLEDANO, 2007; HALLIWELL, 1996). Este fato contribui para a dificuldade de desenvolver sequestradores de radicais hidroxila com atividade *in vivo*. Assim, a prevenção da geração de radicais hidroxila é a melhor maneira de evitar seus efeitos deletérios. Por exemplo, a quelação de íons metálicos livres alcançada pelo PS-Pb é um modo eficiente para atingir este objetivo.

Atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* estão associadas a efeitos terapêuticos em doenças inflamatórias (SILVA et al., 2011; SOUSA et al., 2016), uma vez que a exacerbção da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) leva a um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, seguido por uma resposta imune elevada e desregulada que promove dano tecidual (CUZZOCREA et al., 1997; KO et al., 2017; SCHIEBER & CHANDEL, 2014). Assim sendo, ensaios para avaliar o potencial anti-inflamatório do PS-Pb foram realizados.

O potencial anti-inflamatório dos polissacarídeos sulfatados das algas vermelhas é bem descrito na literatura, tanto nas doenças em que o processo inflamatório é a principal complicação da doença (BRITO et al., 2014; SILVA et al., 2011), como em modelos inflamatórios experimentais (GRÜNEWALD; GROTH; ALBAN, 2009; SOUSA et al., 2013).

Os resultados demonstraram inicialmente que o PS-Pb, em todas as doses testadas (1, 3 e 10 mg/kg), diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o edema de pata induzido por carragenina em todos os períodos avaliados, com melhores resultados obtidos com as doses de 3 e 10 mg/kg. O modelo de edema de pata induzido por carragenina consiste em um edema agudo e não imunológico acompanhado de infiltração de neutrófilos. O edema ocorre aproximadamente 1 h depois da injeção de

carragenina, atingindo seu efeito máximo após 3 h e sendo mantido por mais de 4 h após o estímulo inflamatório (MORRIS, 2003; SILVA et al., 2013).

O edema induzido pela carragenina é dividido em duas fases. Na fase 1 (1-2 h), o aumento da permeabilidade vascular é principalmente mediado pela liberação de histamina e serotonina. Depois disso, o edema na fase 1 tardia é provocado principalmente por bradicininas (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; GUPTA et al., 2006). A fase 2 (3-4 h) é mantida através da liberação de prostaglandinas e mediada por leucotrienos e polimorfonucleares (GUPTA et al., 2006). As prostaglandinas são moduladores da inflamação produzidas de forma ubíqua, atuando de forma autócrina e parácrina para aumentar a permeabilidade vascular e a migração celular através da produção de substâncias quimioatraentes, como as citocinas pró-inflamatórias (BUCHANAN et al., 2003; HATA & BREYER, 2004; KAUR et al., 2004).

Os resultados obtidos no ensaio de edema de pata induzido por carragenina, durante as duas fases do teste, demonstraram que o PS-Pb possui múltiplos alvos terapêuticos, inibindo diferentes mediadores da inflamação.

Assim, para avaliar a ação do PS-Pb também na permeabilidade vascular, foi realizado um ensaio com dextrana. A dextrana é um agente flogístico que provoca a liberação de aminas vasoativas de mastócitos, como a histamina e a serotonina, causando também irritação local por meio da ativação de cininas. A liberação de aminas vasoativas é seguida por um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos, o que causa edema osmótico, pobre em células e proteínas (DE ARAÚJO et al., 2016; LO; ALMEIDA; BEAVEN, 1982).

Os resultados obtidos nos testes de edema de pata, induzidos tanto por carragenina quanto por dextrana, demonstraram que o PS-Pb possui múltiplos alvos terapêuticos, inibindo diferentes mediadores da inflamação. De forma semelhante, outros polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas mostraram propriedades anti-inflamatórias em modelos clássicos de inflamação usando dextrana e carragenina (CHAVES et al., 2013; COURA et al., 2012; SOUSA et al., 2013), corroborando com os dados apresentados neste estudo e demonstrando o potencial terapêutico desta classe de moléculas.

Houve, como demonstrado, redução significativa do edema de pata induzido por dextrana e por carragenina durante sua fase inicial, indicando uma possível ação do PS-Pb na inibição da liberação de histamina e aminas vasoativas. Sabe-se que

as galactanas podem se ligar a uma ampla gama de receptores ancorados à superfície celular devido à presença de sulfato e à sua carga líquida negativa, formando complexos que bloqueiam a interação de compostos com seus receptores em células-alvo (BEZERRA et al., 2018; RUDTANATIP et al., 2014). Assim, o PS-Pb poderia ligar-se ao receptor presente nos mastócitos e, desta forma, impedir a liberação de histamina.

As propriedades de ligação exibidas pelo PS-Pb também explicariam a atividade inibitória na fase tardia do edema induzido por carragenina, na qual o edema é mantido devido à liberação de prostaglandinas. Assim, uma possível ligação entre o PS-Pb e as enzimas fosfolipase A₂ (PLA₂) e/ou cicloxigenases (COX) 1 e 2 poderia bloquear a cascata de produção e liberação de prostaglandinas, óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β). No entanto, é mais provável que o efeito anti-inflamatório alcançado pelo PS-Pb ocorra devido à capacidade de prevenir o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Os neutrófilos são importantes na fase tardia do edema induzido por carragenina, uma vez que essas células produzem as prostaglandinas que mantêm o edema (FUJISHIMA et al., 1993; NETEA et al., 2017).

De acordo com Pomin (2012), os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas possuem afinidade por glicoconjugados, incluindo as selectinas L e P, expressas na superfície do endotélio. Como os polissacarídeos sulfatados atuam como ligantes para as selectinas, as interações entre os leucócitos e as células endoteliais são reduzidas na presença destas moléculas. Assim, a migração celular de leucócitos ativados é prejudicada (FOXALL et al., 1992; GAME et al., 1998). No entanto, este mecanismo de ação explica apenas parcialmente a atividade anti-inflamatória alcançada pelo PS-Pb (em doses de 3 e 10 mg/kg) na terceira e quarta horas após indução de edema por carragenina. Existem outros agentes importantes para o desenvolvimento do edema nesta fase, dentre eles o NO.

A injeção de carragenina aumenta os níveis de NO produzidos a partir da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a expressão da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) permanece inalterada, a qual mantém um ambiente inflamatório constante devido à vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, especialmente na fase tardia da inflamação (3-6 h após induzida por carragenina) (LAAVOLA et al., 2017; PEREIRA et al., 2012; SREBRO et al., 2019). Os resultados obtidos com técnicas de imunohistoquímica mostraram uma

expressão reduzida de iNOS, corroborando com as hipóteses de que o PS-Pb tenha efeito modulador na produção de NO.

Os ensaios até agora realizados avaliaram os agentes pró-inflamatórios responsáveis pela inflamação em períodos específicos de tempo. Assim, para avaliar o impacto do PS-Pb sobre a inflamação generalizada, foi realizado um estudo imunohistoquímico da expressão do TNF- α . O TNF- α é um regulador chave da resposta inflamatória e a primeira citocina endógena a ser liberada das células imunes, como monócitos e macrófagos, evocando seus efeitos pró-inflamatórios através da transcrição de genes que levam à morte celular, quimiotaxia, diferenciação, proliferação e migração de leucócitos através de barreiras endoteliais e epiteliais. Esses genes são codificados após a ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa-B (NF- κ B). Interessantemente, os níveis de TNF- α estão excessivamente aumentados na presença de NF- κ B, demonstrando a importância do TNF- α na exacerbação do processo inflamatório (ARJUMAND et al., 2019; BRADLEY, 2008; JIAO et al., 2017).

Neste estudo, o PS-Pb (na dose de 3 mg/kg) apresentou atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata que pode estar associada à redução da expressão do TNF- α vista no ensaio imunohistoquímico, uma vez que o PS-Pb obteve efeito terapêutico sustentado ao longo de todo o período de avaliação (1-4 h após injeção de carragenina ou dextrana). No entanto, os mecanismos nos quais os polissacarídeos sulfatados inibem a expressão de TNF- α devem ser investigado mais profundamente.

Por fim, a capacidade antioxidante do PS-Pb foi investigada devido ao importante papel das EROs na progressão da inflamação. Os resultados obtidos após peritonite induzida por carragenina mostraram níveis reduzidos de GSH no líquido peritoneal de animais não tratados em relação ao grupo controle e ao grupo pré-tratado, indicando uma possível ação inibitória do PS-Pb na migração de leucócitos através do endotélio para o local inflamado, uma vez que os neutrófilos aumentam o processo inflamatório pela superprodução de EROs e assim depletam as reservas de GSH (SILVA et al., 2017).

Como o dano oxidativo e a inflamação são os principais causadores da úlcera gástrica (AL-SAYED & EL-NAGA, 2015), a atividade gastroprotetora do PS-Pb foi avaliada no modelo de lesão gástrica induzido por etanol. Modelo

experimental amplamente utilizado para avaliar agentes com potencial atividade anti-ulcerogênica.

Nossos dados mostram que a administração de etanol absoluto induziu graves danos gástricos macroscópicos e microscópicos. No entanto, o pré-tratamento com PS-Pb manteve a integridade da mucosa gástrica contra as lesões causadas pelo etanol. O PS-Pb atingiu seu efeito máximo nas doses de 3 e 10 mg/kg, quando os animais pré-tratados apresentaram uma significativa redução da área ulcerada decorrente da administração de etanol. Portanto, a dose terapêutica mais baixa (3 mg/kg) foi selecionada para investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade gastroprotetora mediada pelo PS-Pb.

A análise microscópica mostra que a administração de etanol induziu um dano gástrico significativo, caracterizado pela interrupção da integridade da mucosa, edema e perda de células epiteliais, os quais causam ruptura na superfície da mucosa e hemorragia acentuada. No entanto, esses eventos prejudiciais foram inibidos pelo pré-tratamento com PS-Pb. Esses dados são consistentes com os encontrados na análise macroscópica e mostram a proteção do PS-Pb contra os efeitos deletérios do etanol sobre a mucosa gástrica.

No que concerne a concentração dos níveis de hemoglobina encontrados na mucosa gástrica após indução de úlceras por etanol, é sabido que sangramentos e hemorragias da mucosa do estômago são alguns dos principais indicadores de gravidade em úlceras gástricas. Há uma hemorragia difusa, aparecendo como bandas alongadas de lesões hemorrágicas com necrose coagulativa das glândulas (SIBILIA et al., 2003; SIDAHMED et al., 2013). O pré-tratamento com PS-Pb reduziu significativamente o dano hemorrágico na mucosa gástrica causado pelo etanol. O resultado obtido neste trabalho corrobora com outro estudo utilizando polissacarídeo sulfatado de alga marinha vermelha, no caso, uma carragenana extraída da alga *S. filiformis* (SOUSA et al., 2016). Além de apresentar efeitos anti-hemorrágicos, o polissacarídeo de *S. filiformis* foi avaliado e exibiu uma notável atividade antioxidante *in vitro*, demonstrando que estas moléculas, independentemente da classificação em ágar ou carragenana, podem desempenhar um papel importante na terapia da úlcera gástrica ao reduzir o dano oxidativo.

A lesão causada pela administração de etanol na mucosa gástrica é multifatorial, no entanto, o estresse oxidativo é um dos principais responsáveis pela doença. A alta concentração de EROs gerada causa um desequilíbrio oxidativo que

leva ao consumo de GSH e aumenta os níveis de MDA. O dano na membrana celular provocado pelas EROs causa perda da integridade da membrana e desregulação da sinalização redox celular, o que leva à apoptose e dano ao DNA (WU et al., 2014; YU et al., 2016). O MDA é o produto final da peroxidação lipídica mediada por EROs e um biomarcador típico de dano celular relacionado ao estresse oxidativo (CHAUDHARI et al., 2009; DURSUN et al., 2009).

O GSH é crucial para a defesa antioxidante e homeostase redox celular, atuando diretamente na manutenção da mucosa gástrica contra EROs (LIEDSCHULTE et al., 2010). Segundo Mizui, Shimono e Doteuchi (1987), o GSH está presente em altas concentrações na mucosa gástrica, sugerindo seu papel protetor como antioxidante endógeno. O estresse oxidativo produzido pelo etanol leva ao esgotamento do GSH e aumento dos níveis de MDA. A ação gastroprotetora vista nos ensaios *in vivo*, secundária a inibição do estresse oxidativo na mucosa gástrica, ratifica o potencial antioxidante do PS-Pb e demonstra um dos principais mecanismos de ação no combate às ulcerações gástricas.

Além do equilíbrio redox, o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica é outro fator chave para a manutenção da atividade fisiológica e integridade da mucosa do estômago, suprindo a mucosa gástrica com nutrientes, hormônios e oxigênio. A redução dessa proteção também é uma importante causa do desenvolvimento da úlcera (KAWANO & TSUJI, 2000; LUCETTI et al., 2017). Assim, a fim de avaliar se o efeito protetor obtido com o pré-tratamento de PS-Pb poderia estar relacionado com o aumento do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica, ensaios com inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e do canal de potássio sensível ao ATP (K_{ATP}), L-NAME e glibenclamida, respectivamente, foram realizados.

A enzima NOS é expressa constitutivamente, ou de forma induzível, e produz NO através do metabolismo da L-arginina. O NO é uma molécula gasosa de sinalização onipresente com múltiplas funções biológicas e que contribui significativamente para a integridade da mucosa gástrica através de uma ação vasorelaxante (MAGIEROWSKI et al., 2015; ZHANG et al., 2011). A importância do NO é evidenciada quando os resultados são analisados e observa-se que o efeito protetor do PS-Pb depende da presença de NO, uma vez que a inibição da síntese de NO aboliu sua ação gastroprotetora.

A produção de NO, e, conseqüentemente, a sua via junto ao monofosfato cíclico de guanosina (NO/GMPc) é crucial para a vasodilatação e para a proteção da

mucosa gástrica. Entretanto, a vasodilatação também é mediada por outras vias de sinalização, como a via do canal K_{ATP} .

O mecanismo pelo qual o canal K_{ATP} causa vasodilatação depende de uma hiperpolarização provocada pela abertura desses canais na membrana celular do músculo liso vascular. Uma vez que o canal é aberto, o efluxo de íons K^+ aumenta, hiperpolarizando a célula. Assim, ocorre o fechamento de canais de cálcio ativados por voltagem (Ca^{2+}), diminuição da entrada de Ca^{2+} pela membrana e redução da concentração de Ca^{2+} no citoplasma celular, causando vasodilatação (JACKSON, 2017; SOBEY, 2001).

Os resultados relativos ao papel do canal K_{ATP} nos efeitos terapêuticos do PS-Pb foram analisados utilizando o bloqueador glibenclamida associado com PS-Pb. O uso de glibenclamida inibiu parcialmente a ação do PS-Pb, uma vez que a glibenclamida não reverteu completamente a atividade terapêutica apresentada pelo PS-Pb.

Esses dados mostram a importância da via NO/GMPc na melhora da úlcera gástrica induzida pelo etanol e sua associação com os efeitos terapêuticos do PS-Pb. Além disso, os resultados também demonstraram que o canal K_{ATP} não está fortemente relacionado à atividade gastroprotetora do PS-Pb, ao contrário de outras moléculas sulfatadas, como o H_2S , um modulador da contratilidade vascular que previne o dano gástrico induzido pelo etanol através da ativação do canal K_{ATP} (MEDEIROS et al., 2009). Além disso, os dados corroboram com os resultados obtidos utilizando outros polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas. Silva et al. (2011) e Damasceno et al. (2013), por exemplo, relataram efeitos protetores dependentes do NO de polissacarídeos sulfatados extraídos das algas vermelhas *G. caudata* e *H. musciformis*, respectivamente.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Pterocladia beachiae* (PS-Pb) é uma galactose do tipo ágar que apresenta características inerentes aos polissacáridos sulfatados de algas vermelhas, como elevada massa molar e baixo teor de sulfato, mas também exibe características únicas, como a presença de xilose em sua estrutura química. O PS-Pb apresenta ainda excelentes propriedades antioxidantes *in vitro* e significativa atividade anti-inflamatória, reduzindo o edema de pata induzido por carragenina e dextrana, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) na peritonite induzida por carragenina e a expressão de iNOS e TNF- α em patas edemaciadas. Por fim, o PS-Pb mostra ação terapêutica contra a úlcera gástrica induzida por etanol, através da redução do dano oxidativo e dos níveis de hemoglobina (indicativo de hemorragia) e da regulação do fluxo sanguíneo para a mucosa gástrica, através de modulações com a enzima NOS e o canal K_{ATP} .

Assim, devido ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, o PS-Pb pode ser considerado um novo candidato para o tratamento de doenças e complicações inflamatórias e oxidativas, como a úlcera gástrica, no entanto, mais estudos, que visem elucidar os mecanismos de ação, ainda são necessários.

REFERÊNCIAS

- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.
- ALENCAR, P. O. C.; LIMA, G. C.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E.; RIBEIRO, C. V. P.; SOUSA, W. M.; SOMBRA, V. G.; ABREU, C. M. W. S.; ABREU, E. S.; PONTES, E. O. B.; OLIVEIRA, A. C.; DE PAULA, R. C. M.; FREITAS, A. L. P. A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: *In vitro* and *in vivo* activities. **Food Hydrocoll.** [s.l.]. v. 90, p. 28-34, 2019.
- AL-SAYED, E.; EL-NAGA, R. N. Protective role of ellagitannins from *Eucalyptus citriodora* against ethanol-induced gastric ulcer in rats: impact on oxidative stress, inflammation and calcitonin-gene related peptide. **Phytomedicine.** [s.l.]. v. 22, n. 1, p. 5-15, 2015.
- ALVES, M. G. D. C. F.; DORE, C. M. P. G.; CASTRO, A. J. G.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K. M.; MARINHO-SORIANO, E.; BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, E. L. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. **J Appl Phycol.** [s.l.]. v. 24, n. 5, p. 1217-1227, 2012.
- ANAND, J.; SATHUVAN, M.; BABU, G. V.; SAKTHIVEL, M.; PALANI, P.; NAGARAJ, S. Bioactive potential and composition analysis of sulfated polysaccharide from *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgeson. **Int J Biol Macromol.** [s.l.]. v. 111, p. 1238-1244, 2018.
- ARAB, H. H.; SALAMA, S. A.; OMAR, H. A.; ARAFA, E. S. A.; MAGHRABI, I. A. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: novel anti-ulcer actions. **PloS one.** v. 10, n. 3, p. 1-21, 2015.
- ARJUMAND, S.; SHAHZAD, M.; SHABBIR, A.; YOUSAF, M. Z. Thymoquinone attenuates rheumatoid arthritis by downregulating TLR2, TLR4, TNF- α , IL-1, and NF κ B expression levels. **Biomed Pharmacother.** [s.l.]. v. 111, p. 958-963, 2019.
- ARMAN, M.; QADER, S. A. U. Structural analysis of kappa-carrageenan isolated from *Hypnea musciformis* (red algae) and evaluation as an elicitor of plant defense mechanism. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 88, n. 4, p. 1264-1271, 2012.
- ARMISEN, R.; GALATAS, F. Agar. *In*: PHILIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Handbook of Hydrocolloids.** Cambridge, Inglaterra: Woodhead Publishing Limited, 2000.

BACCHI, S.; PALUMBO, P.; SPONTA, A.; COPPOLINO, M. F. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.** [s.l.]. v. 11, n. 1, p. 52-64, 2012.

BARROS, F. C. N.; SILVA, D. C.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; DE PAULA, R. C. M. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 92, n. 1, p. 598-603, 2013.

BARSANTI, L. The World of Algae. In: EVANGELISTA, V.; BARSANTI, L.; FRASSANITO, A. M.; PASSARELLI V.; GUALTIERI, P. (Eds.). **Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology.** Dordrecht, Holanda: Springer, 2008.

BENEMANN, J. R.; WOERTZ, I.; LUNDQUIST, T. Autotrophic microalgae biomass production: from niche markets to commodities. **Ind Biotechnol.** [s.l.]. v. 14, n. 1, p. 3-10, 2018.

BERTONI, F. A.; GONZÁLEZ, J. C.; GARCÍA, S. I.; SALA, L. F.; BELLÚ, S. E. Application of chitosan in removal of molybdate ions from contaminated water and groundwater. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 180, p. 55-62, 2018.

BERTONI, F. A.; MEDEOT, A. C.; GONZÁLEZ, J. C.; SALA, L. F.; BELLÚ, S. E. Application of green seaweed biomass for Mo^{VI} sorption from contaminated waters. Kinetic, thermodynamic and continuous sorption studies. **J Colloid Interface Sci.** [s.l.]. v. 180, p. 55-62, 2015.

BEZERRA, F. F.; LIMA, G. C.; SOUSA, N. A.; SOUSA, W. M.; COSTA, D. S.; BARROS, F. C. N.; MEDEIROS, J. V. R.; FREITAS, A. L. P. Antidiarrheal activity of a novel sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cervicornis*. **J Ethnopharmacol.** [s.l.]. v. 180, p. 55-62, 2018.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature.** [s.l.]. v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BONANNO, G.; ORLANDO-BONACA, M. Chemical elements in Mediterranean macroalgae. A review. **Ecotoxicol Environ Saf.** [s.l.]. v. 148, p. 44-71, 2018.

BOUHLAL, R.; HASLIN, C.; CHERMANN, J. C.; COLLIEC-JOUAULT, S.; SINQUIN, C.; SIMON, G.; CERANTOLA, S.; RIADI, H.; BOURGOUGNON, N. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). **Mar Drugs.** [s.l.]. v. 9, n. 7, p. 1187-1209, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** [s.l.]. v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol.** [s.l.]. v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-FOOD SCI TECHNOL.** [s.l.]. v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRITO, T. V.; BARROS, F. C. N.; SILVA, R. O.; DIAS JÚNIOR, G. J.; C JÚNIOR, J. S.; FRANCO, A. X.; SOARES, P. M. G.; CHAVES, L. S.; ABREU, C. M. W. S.; DE PAULA R. C. M.; SOUZA, M. H. L. P.; FREITAS, A. L. P.; BARBOSA, A. L. R. Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 151, p. 957-964, 2016.

BRITO, T. V.; NETO, J. P.; PRUDÊNCIO, R. S.; BATISTA, J. A.; JÚNIOR, J. S.; SILVA, R. O.; FRANCO, A. X.; ARAGÃO, K. S.; SOARES, P. M. G.; SOUZA, M. H. L. P.; CHAVES, L. S.; FREITAS, A. L. P.; MEDEIROS, J. V. R.; BARBOSA, A. L. R. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **J Pharm Pharmacol.** [s.l.]. v. 66, n. 8, p. 1161-1170, 2014.

BRUNE, K.; PATRIGNANI, P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Pain Res.** [s.l.]. v. 8, p. 105-118, 2015.

BUCHANAN, F. G.; WANG, D.; BARGIACCHI, F.; DUBOIS, R. N. Prostaglandin E₂ regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. **J Biol Chem.** [s.l.]. v. 278, n. 37, p. 35451-35457, 2003.

BYEON, S.; OH, J.; LIM, J.; LEE, J.; KIM, J. S. Protective effects of *Dioscorea batatas* flesh and peel extracts against ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Nutrients.** [s.l.]. v. 10, n. 11(1680), p. 1-14, 2018.

CABRERA, J. M.; STORTZ, C. A.; RODRÍGUEZ, M. C. A sulfated galactan from the mucilaginous sheath of the red filamentous alga *Chroodactylon ornatum* (Stylonematophyceae, Rhodophyta). **J Appl Phycol.** [s.l.]. v. 26, n. 4, p. 1801-1811, 2014.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA JR., D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.

CARDOSO, M. A. **Determinação da estrutura química de xilomanas e galactanas sulfatadas isoladas de macroalgas marinhas (Cerámiales, Rhodophyta)**. 2007. 108 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C.F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol**. [s.l.]. v. 51, p. 15-25, 2013.

CASTRO, J. P. L. D., COSTA, L. E. C., PINHEIRO, M. P., FRANCISCO, T. D. S., VASCONCELOS, P. H. M. D., FUNARI, L. M., DAUDT, R. M., SANTOS, G. R. C., CARDOZO, N. S. M., FREITAS, A. L. P. Polysaccharides of red alga *Gracilaria intermedia*: structure, antioxidant activity and rheological behavior. **Polímeros**. [s.l.]. v. 28, n. 2, p. 178-186, 2018.

CHAN, H. K.; ISMAIL, S. Side effects of chemotherapy among cancer patients in a Malaysian General Hospital: experiences, perceptions and informational needs from clinical pharmacists. **Asian Pac J Cancer Prev**. [s.l.]. v. 15, n. 13, p. 5305-5309, 2014.

CHAN, T. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. **Lancet Oncol**. [s.l.]. v. 3, n. 3, p. 166-174, 2002.

CHAUDHARI, M.; JAYARAJ, R.; BHASKAR, A. S. B.; LAKSHMANA RAO, P. V. Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. **Toxicology**. [s.l.]. v. 262, n. 2, p. 153-161, 2009.

CHAVES, L. S.; NICOLAU, L. A.; SILVA, R. O.; BARROS, F. C.; FREITAS, A. L. P.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H.; BARBOSA, A. L.; MEDEIROS, J. V. R. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. [s.l.]. v. 35, n. 1, p. 93-100, 2013.

CHEN, K.; RÍOS, J. J.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; ROCA, M. Comprehensive chlorophyll composition in the main edible seaweeds. **Food Chem**. [s.l.]. v. 228, p. 625-633, 2017.

CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT-FOOD SCI TECHNOL**. [s.l.]. v. 41, n. 6, p. 1067-1072, 2008.

CHRISTIAEN, D.; BODARD, M. Spectroscopie infrarouge de films d'agar de *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss. **Bot Mar.** [s.l.]. v. 26, n. 9, p. 425-428, 1983.

CIAN, R. E.; SALGADO, P. R.; DRAGO, S. R.; GONZÁLEZ, R. J.; MAURI, A. N. Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. **Food Chem.** [s.l.]. v. 146, p. 6-14, 2014.

COSTA, D. S.; ARAÚJO, T. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K.; PACÍFICO, D. M.; SOUSA, F. B.; NICOLAU, L. A.; CHAVES, L. S.; BARROS, F. C.; FREITAS, A. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. Sulfated polysaccharide isolated from the seaweed *Gracilaria caudata* exerts an antidiarrhoeal effect in rodents. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** [s.l.]. v. 118, n. 6, p. 440-448, 2015.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomed Pharmacother.** [s.l.]. v. 64, n. 1, p. 21-28, 2010.

COURA, C. O.; ARAÚJO, I. W.; VANDERLEI, E. S.; RODRIGUES, J. A.; QUINDERÉ, A. L.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N.; MENEZES, D. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J.; EVANGELISTA, J. S.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** [s.l.]. v. 110, n. 4, p. 335-341, 2012.

CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. **Compr Rev Food Sci Food Saf.** [s.l.]. v. 11, n. 2, p. 148-173, 2012.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; GILAD, E.; HAKE, P.; SALZMAN, A. L.; SZABÓ, C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. **J Pineal Res.** [s.l.]. v. 23, n. 2, p. 106-116, 1997.

DAMASCENO, S. R.; RODRIGUES, J. C.; SILVA, R. O.; NICOLAU, L. A. D.; CHAVES, L. S.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Role of the NO/K_{ATP} pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Braz J Pharmacogn.** [s.l.]. v. 23, n. 2, p. 320-328, 2013.

DANIAL, W. H.; ABDUL MAJID, Z.; MOHD MUHID, M. N.; TRIWAHYONO, S.; BAKAR, M. B.; RAMLI, Z. The reuse of wastepaper for the extraction of cellulose nanocrystals. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 118, p. 165-169, 2015.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol.** [s.l.]. v. 8, n. 10, p. 813-824, 2007.

DE ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L. G.; SILVA, J. D. F. T.; DE FREITAS MACIEL, G.; RIBEIRO, N. A.; SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI E.; RIBEIRO, K. A.; CHAVES, H. V.; PEREIRA, K. M.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Analgesic and anti-inflammatory actions on bradykinin route of a polysulfated fraction from alga *Ulva lactuca*. **Int J Biol Macromol.** [s.l.]. v. 92, p. 820-830, 2016.

DEL OLMO, A.; PICON, A.; NUÑEZ, M. The microbiota of eight species of dehydrated edible seaweeds from North West Spain. **Food Microbiol.** [s.l.]. v. 70, p. 224-231, 2018.

DEL VECCHIO, G.; SPAHN, V.; STEIN, C. Novel opioid analgesics and side effects. **ACS Chem Neurosci.** [s.l.]. v. 8, n. 8, p. 1638-1640, 2017.

DI ROSA, M. L.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol.** [s.l.]. v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DIAS, H. B.; KRAUSE, G. C.; SQUIZANI, E. D.; LIMA, K. G.; SCHUSTER, A. D.; PEDRAZZA, L.; BASSO, B. S.; MARTHA, B. A.; MESQUITA, F. C.; NUNES, F. B.; DONADIO, M. V. F.; OLIVEIRA, J. R. Fructose-1,6-bisphosphate reverts iron-induced phenotype of hepatic stellate cells by chelating ferrous ions. **Biomaterials.** [s.l.]. v. 30, n. 4, p. 549-558, 2017.

DUARTE, M. E.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A.; TULIO, S.; CEREZO, A. S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydr Res.** [s.l.]. v. 337, n. 12, p. 1137-1144, 2002.

DURSUN, H.; BILICI, M.; ALBAYRAK, F.; OZTURK, C.; SAGLAM, M. B.; ALP, H. H.; SULEYMAN, H. Antiulcer activity of fluvoxamine in rats and its effect on oxidant and antioxidant parameters in stomach tissue. **BMC Gastroenterol.** [s.l.]. v. 9, n. 36, p. 1-10, 2009.

ERREA, M. I., MATULEWICZ, M. C. Unusual structures in the polysaccharides from the red seaweed *Pterocladia capillacea* (Gelidiaceae, Gelidiales). **Carbohydr Res.** [s.l.]. v. 338, n. 9, p. 943-953, 2003.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **J Biol Chem.** [s.l.]. v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FELSON, D. T. Safety of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **N Engl J Med.** [s.l.]. v. 375, n. 26, p. 2595-2596, 2016.

FIDELIS, G. P.; CAMARA, R. B.; QUEIROZ, M. F.; COSTA, M. S. S. P.; SANTOS, P. C.; ROCHA, H. A.; COSTA, L. S. Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, *Gracilaria birdiae*. **Molecules.** [s.l.]. v. 19, n. 11, p. 18511-18526, 2014.

FLEITA, D.; EL-SAYED, M.; RIFAAT, D. Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. **LWT-FOOD SCI TECHNOL.** [s.l.]. v. 63, n. 2, p. 1236-1244, 2015.

FOTI, M. C. Use and Abuse of the DPPH[•] Radical. **J Agric Food Chem.** [s.l.]. v. 63, n. 40, p. 8765-8776, 2015.

FOXALL, C.; WATSON, S. R.; DOWBENKO, D.; FENNIE, C.; LASKY, L. A.; KISO, M.; HASEGAWA, A.; ASA, D.; BRANDLEY, B. K. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis (x) oligosaccharide. **J Cell Biol.** [s.l.]. v. 117, n. 4, p. 895-902, 1992.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; DE REVIERS, B.; PRADO, J. F.; RÉZIG, S. H. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica.** Porto Alegre: Ed. Artmed, 2010.

FUJISHIMA, S.; HOFFMAN, A. R.; VU, T.; KIM, K. J.; ZHENG, H.; DANIEL, D.; KIM, Y.; WALLACE, E. F.; LARRICK, J. W.; RAFFIN, T. A. Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF- α , and IL-1 β . **J Cell Physiol.** [s.l.]. v. 154, n. 3, p. 478-485, 1993.

GONZAGA, M. L. C.; RICARDO, N. M.; HEATLEY, F.; SOARES, S. D. A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 60, n. 1, p. 43-49, 2005.

GRÜNEWALD, N.; GROTH, I.; ALBAN, S. Evaluation of seasonal variations of the structure and anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides extracted from the red alga *Delesseria sanguinea* (Hudson) Lamouroux (Ceramiales, Delesseriaceae). **Biomacromolecules**. [s.l.]. v. 10, n. 5, p. 1155-1162, 2009.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life Sci**. [s.l.]. v. 78, n. 8, p. 803-811, 2006.

GUNTER, B. R.; BUTLER, K. A.; WALLACE, R. L.; SMITH, S. M.; HARIRFOROOSH, S. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: a meta-analysis. **J Clin Pharm Ther**. [s.l.]. v. 42, n. 1, p. 27-38, 2017.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; GOMATHI, P.; SELVAN, V. T. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. **BMC Complement Altern Med**. [s.l.]. v. 6, n. 1, p. 1-6, 2006.

GURPILHARES, D. B.; MOREIRA, T. R.; DA LUZ BUENO, J.; CINELLI, L. P.; MAZZOLA, P. G.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Algae's sulfated polysaccharides modifications: Potential use of microbial enzymes. **Process Biochem**. [s.l.]. v. 51, n. 8, p. 989-998, 2016.

GUTTERIDGE, J. M. C. Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. **Biochem J**. [s.l.]. v. 243, n. 3, p. 709-714, 1987.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr**. [s.l.]. v. 16, n. 1, p. 33-50, 1996.

HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. **J Pharm Pharm Sci**. [s.l.]. v. 16, n. 5, p. 821-847, 2013.

HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacol Ther**. [s.l.]. v. 103, n. 2, p. 147-166, 2004.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Semin Immunol**. [s.l.]. v. 27, n. 3, p. 149-160, 2015.

HORTA, P. A.; AMANCIO, E.; COIMBRA, C. S.; OLIVEIRA, E. C. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. **Hoehnea**. [s.l.]. v. 28, n. 3, p. 243-265, 2001.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem.** [s.l.]. v. 29, n. 11, p. 1349-1353, 1981.

HU, T.; LIU, D.; CHEN, Y.; WU, J.; WANG, S. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* *in vitro*. **Int J Biol Macromol.** [s.l.]. v. 46, n. 2, p. 193-198, 2010.

HUSS, V. A.; FRANK, C.; HARTMANN, E. C.; HIRMER, M.; KLOBOUCEK, A.; SEIDEL, B. M.; WENZELER, P.; KESSLER, E. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). **J Phycol.** [s.l.]. v. 35, n. 3, p. 587-598, 1999.

ITO, M.; KOBAYASHI, K.; HIKIHARA, R.; ISHIMARU, M.; SHIBATA, T.; HATATE, H.; TANAKA, R. Analysis of functional components and radical scavenging activity of 21 algae species collected from the Japanese coast. **Food Chem.** [s.l.]. v. 255, p. 147-156, 2018.

JACKSON, W. F. Potassium channels in regulation of vascular smooth muscle contraction and growth. *In*: KHALIL, R. A. (Ed.). **Advances in Pharmacology (v. 78)**. Vascular Pharmacology: Smooth Muscle. Cambridge, MA, Estados Unidos: Academic Press, 2017.

JAY MURRAY, F.; TYL, R. W.; SULLIVAN, F. M.; TIWARY, A. K.; CAREY, S. Developmental toxicity study of sodium molybdate dihydrate administered in the diet to Sprague Dawley rats. **Reprod Toxicol.** [s.l.]. v. 49, p. 202-208, 2014.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Mar Drugs.** [s.l.]. v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

JIAO, J.; MAO, R.; TENG, D.; WANG, X.; HAO, Y.; YANG, N.; WANG, X.; FENG, X.; WANG, J. *In vitro* and *in vivo* antibacterial effect of NZ2114 against *Streptococcus suis* type 2 infection in mice peritonitis models. **AMB Express.** [s.l.]. v. 7, n. 1, p. 44, 2017.

KAIN, V.; PRABHU, S. D.; HALADE, G. V. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. **Basic Res Cardiol.** [s.l.]. v. 109, n. 6, p. 444, 2014.

KAUR, G.; HAMID, H.; ALI, A.; ALAM, M. S.; ATHAR, M. Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. **J Ethnopharmacol.** [s.l.]. v. 90, n. 2-3, p. 285-292, 2004.

KAWANO, S.; TSUJI, S. Role of mucosal blood flow: a conceptional review in gastric mucosal injury and protection. **J Gastroenterol Hepatol.** [s.l.]. v. 15, p. 1-6, 2000.

KILINÇ, B.; CIRIK, S.; TURAN, G.; TEKOGUL, H.; KORU, E. Seaweeds for food and industrial applications. *In*: MUZZALUPO, I. (Ed.). **Food Industry.** Londres, Inglaterra: IntechOpen Limited. 2013.

KISKER, C.; SCHINDELIN, H.; REES, D. C. Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. **Annu Rev Biochem.** [s.l.]. v. 66, n. 1, p. 233-267, 1997.

KO, E. Y.; CHO, S. H.; KWON, S. H.; EOM, C. Y.; JEONG, M. S.; LEE, W.; KIM, S. Y.; HEO, S. J.; AHN, G.; LEE, K. P.; JEON, Y. J.; KIM, K. N. The roles of NF- κ B and ROS in regulation of pro-inflammatory mediators of inflammation induction in LPS-stimulated zebrafish embryos. **Fish Shellfish Immunol.** [s.l.]. v. 68, p. 525-529, 2017.

KOPEL, M.; HELBERT, W.; BELNIK, Y.; BURAVENKOV, V.; HERMAN, A.; BANIN E. New family of ulvan lyases identified in three isolates from the Alteromonadales Order. **J Biol Chem.** [s.l.]. v. 291, n. 11, p. 5871-5878, 2016.

KOUZUMA, A.; WATANABE, K. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. **Curr Opin Biotechnol.** [s.l.]. v. 33, p. 125-129, 2015.

KUNA, L.; JAKAB, J.; SMOLIC, R.; RAGUZ-LUCIC, N.; VCEV, A.; SMOLIC, M. Peptic ulcer disease: A brief review of conventional therapy and herbal treatment options. **J Clin Med.** [s.l.]. v. 8, n. 2, p. 179, 2019.

LAAVOLA, M.; LEPPÄNEN, T.; ERÄSALO, H.; HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; MOILANEN, E. Anti-inflammatory effects of nortrachelogenin in murine J774 macrophages and in carrageenan-induced paw edema model in the mouse. **Planta Med.** [s.l.]. v. 234, n. 06, p. 519-526, 2017.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules.** [s.l.]. v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. *In*: JUANES, J. A.; SANTELICES, B.; MCLACHLAN, J. L. (Eds.). **International Workshop on Gelidium.** Dordrecht, Holanda: Springer, 1991.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology.** [s.l.]. v. 94, n. 6, p. 1254-1262, 1988.

LANAS, A.; CHAN, F. K. Peptic ulcer disease. **The Lancet**. [s.l.]. v. 390, n. 10094, p. 613-624, 2017.

LEAL, M. C.; MUNRO, M. H.; BLUNT, J. W.; PUGA, J.; JESUS, B.; CALADO, R.; ROSA R.; MADEIRA, C. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. **Nat Prod Rep**. [s.l.]. v. 30, n. 11, p. 1380-1390, 2013.

LEE, H. N.; NA, H. K.; SURH, Y. J. Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy. **Semin Immunopathol**. v. 35, n. 2, p. 151-161, 2013.

LEE, W. K.; LIM, Y. Y.; LEOW, A. T. C.; NAMASIVAYAM, P.; ABDULLAH, J. O.; HO, C. L. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. **Carbohydr Polym**. [s.l.]. v. 164, p. 23-30, 2017.

LELIAERT, F.; TRONHOLM, A.; LEMIEUX, C.; TURMEL, M.; DEPRIEST, M. S.; BHATTACHARYA, D.; KAROL, K. G.; FREDERICQ, S.; ZECHMAN, F. W.; LOPEZ-BAUTISTA, J. M. Chloroplast phylogenomic analyses reveal the deepest-branching lineage of the Chlorophyta, Palmophyllophyceae class. nov. **Sci Rep**. [s.l.]. v. 6, (25367), p. 1-13, 2016.

LEÓDIDO, A. C. M.; COSTA, L. E.; ARAÚJO, T. S.; COSTA, D. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K.; SOUSA, F. B.; FILHO, M. D.; VASCONCELOS, D. F.; SILVA, F. R.; NOGUEIRA, K. M.; ARAÚJO, A. R.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice. **Int J Biol Macromol**. [s.l.]. v. 97, p. 34-45, 2017.

LEWIS, L. A.; MCCOURT, R. M. Green algae and the origin of land plants. **Am J Bot**. [s.l.]. v. 91, n. 10, p. 1535-1556, 2004.

LI, H.; YU, X.; JIN, Y.; ZHANG, W.; LIU, Y. Development of an eco-friendly agar extraction technique from the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis*. **Bioresour Technol**. [s.l.]. v. 99, n. 8, p. 3301-3305, 2008.

LI, X.; CHEN, D.; WANG, G.; LU, Y. Probing the interaction of human serum albumin with DPPH in the absence and presence of the eight antioxidants. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**. [s.l.]. v. 137, p. 1144-1152, 2015.

LIANG, W.; MAO, X.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydr Polym**. [s.l.]. v. 101, p. 776-785, 2014.

LIEDSCHULTE, V.; WACHTER, A.; ZHIGANG, A.; RAUSCH, T. Exploiting plants for glutathione (GSH) production: uncoupling GSH synthesis from cellular controls results in unprecedented GSH accumulation. **Plant Biotechnol J.** [s.l.]. v. 8, n. 7, p. 807-820, 2010.

LINS, K. O. A.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFOA, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J Appl Toxicol.** [s.l.]. v. 29, n. 1, p. 20-26, 2009.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther.** [s.l.]. v. 221, n. 1, p. 261-267, 1982.

LÜ, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med.** [s.l.]. v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LUCETTI, L. T.; SILVA, R. O.; SANTANA, A. P. M.; TAVARES, B. M.; VALE, M. L.; SOARES, P. M. G.; LIMA JÚNIOR, F. J.; MAGALHÃES, P. J.; QUEIROZ CUNHA, F.; ALBUQUERQUE RIBEIRO, R.; MEDEIROS, J. V. R.; SOUZA, M. H. L. P. Nitric oxide and hydrogen sulfide interact when modulating gastric physiological functions in rodents. **Dig Dis Sci.** [s.l.]. v. 62, n. 1, p. 93-104, 2017.

LV, Y.; YANG, B.; ZHAO, X.; ZHANG, J.; YU, G. Structural characterization of a hybrid carrageenan-like sulfated galactan from a marine red alga *Furcellaria lumbricalis*. In: STENGEL D., CONNAN S. (Eds.). **Natural products from marine algae. Methods in molecular biology (v. 1308)**. Nova Iorque, NY, Estados Unidos: Humana Press, 2015.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J.** [s.l.]. v. 1, n. 6, p. 441-445, 1987.

MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 71, n. 4, p. 559-565, 2008.

MAGIEROWSKI, M.; MAGIEROWSKA, K.; KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules.** [s.l.]. v. 20, n. 5, p. 9099-9123, 2015.

MANGLIK, A.; LIN, H.; ARYAL, D. K.; MCCORVY, J. D.; DENGLER, D.; CORDER, G.; LEVIT, A.; KLING, R. C.; BERNAT, V.; HÜBNER, H.; HUANG, X. P.; SASSANO, M. F.; GIGUÈRE, P. M.; LÖBER, S.; DA DUAN, SCHERRER, G.; KOBILKA, B. K.; GMEINER, P. ROTH, B. L.; SHOICHET, B. K. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. **Nature**. [s.l.]. v. 537, n. 7619, p. 185-190, 2016.

MASKREY, B. H.; MEGSON, I. L.; WHITFIELD, P. D.; ROSSI, A. G. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. [s.l.]. v. 31, n. 5, p. 1001-1006, 2011.

MATSUHIRO, B.; RIVAS, P. Second-derivative Fourier transform infrared spectra of seaweed galactans. **J Appl Phycol**. [s.l.]. v. 5, n. 1, p. 45-51, 1993.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Int J Biol Macromol**. [s.l.]. v. 31, n. 1-3, p. 87-95, 2002.

McCANDLESS, E. L.; WEST, J. A.; GUIRY, M. D. Carrageenan patterns in the Gigartinales. **Biochem Syst Ecol**. [s.l.]. v. 11, n. 3, p. 175-182, 1983.

McHUGH, D. J. **A guide to seaweed industry**. Roma, Itália: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2003.

MEDEIROS, J. V. R.; BEZERRA, V. H.; GOMES, A. S.; BARBOSA, A. L. R.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SOARES, P. M. G.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. L. P. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **J Pharmacol Exp Ther**. [s.l.]. v. 330, n. 3, p. 764-770, 2009.

MEDEIROS, J. V. R.; GADELHA, G. G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. A.; SOARES, P. M. G.; SANTOS, A. A.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Role of the NO/cGMP/K_{ATP} pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **Br J Pharmacol**. [s.l.]. v. 153, n. 4, p. 721-727, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**. [s.l.]. v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. [s.l.]. v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MEENAKSHI, S.; UMayAPARVATHI, S.; SARAVANAN, R.; MANIVASAGAM, T.; BALASUBRAMANIAN, T. Hepatoprotective effect of fucoidan isolated from the seaweed *Turbinaria decurrens* in ethanol intoxicated rats. **Int J Biol Macromol.** [s.l.]. v. 67, p. 367-372, 2014.

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*. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 49, n. 4, p. 491-498, 2002.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res.** [s.l.]. v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. **Jpn J Pharmacol.** [s.l.]. v. 44, n. 1, p. 43-50, 1987.

MOLLION, J.; ANDRIANTSIFERANA, M.; SEKKAL, M. A study of the phycocolloids from *Gelidium madagascariense* and *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) collected on the south coasts of Madagascar. **Hydrobiologia.** [s.l.]. v. 204, n. 1, p. 655-659, 1990.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *In*: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. (Eds.). **Inflammation protocols. Methods in molecular biology (v. 225)**. Nova Iorque, NY, Estados Unidos: Humana Press, 2003.

MUTHUSWAMY, E.; RAMADEVI, S. S.; VASAN, H. N.; GARCIA, C.; NOÉ, L.; VERELST, M. Highly stable Ag nanoparticles in agar-agar matrix as inorganic-organic hybrid. **J Nanopart Res.** [s.l.]. v. 9, n. 4, p. 561-567, 2007.

NARAYANAN, M.; REDDY, K. M.; MARSICANO, E. Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection. **Mo Med.** [s.l.]. v. 115, n. 3, p. 219, 2018.

NETEA, M. G.; BALKWILL, F.; CHONCHOL, M.; COMINELLI, F.; DONATH, M. Y.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; GOLENBOCK, D.; GRESNIGT, M. S.; HENEKA, M. T.; HOFFMAN, H. M.; HOTCHKISS, R.; JOOSTEN, L. A. B.; KASTNER, D. L.; KORTE, M.; LATZ, E.; LIBBY, P.; MANDRUP-POULSEN, T.; MANTOVANI, A.; MILLS, K. H. G.; NOWAK, K. L.; O'NEILL, L. A.; PICKKERS, P.; VAN DER POLL, T.; RIDKER, P. M.; SCHALKWIJK, J.; SCHWARTZ, D. A.; SIEGMUND, B.; STEER, C. J.; TILG, H.; VAN DER MEER, J. W. M.; VAN DE

VEERDONK, F. L.; DINARELLO, C. A. A guiding map for inflammation. **Nat Immunol.** [s.l.]. v. 18, n. 8, p. 826, 2017.

NOMURA, T.; KIKUCHI, M.; KUBODERA, A.; KAWAKAMI, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). **Biochem Mol Biol Int.** [s.l.]. v. 42, n. 2, p. 361-370, 1997.

OLIVEIRA, A. P.; SOUZA, L. K. M.; ARAÚJO, T. S. L.; ARAÚJO, S.; NOGUEIRA, K. M.; SOUSA, F. B. M.; SILVA, R. O.; PACÍFICO, D. M.; MARTINS, C. S.; BRITO, G. A. C.; SOUZA, M. H. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 protects against gastric damage induced by ethanol administration in mice: Role of TRPV1/substance P axis. **Nutrients.** [s.l.]. v. 11, n. 1, p. 208, 2019.

OLIVEIRA, S. R. M.; NASCIMENTO, A. E.; LIMA, M. E. P.; LEITE, Y. F. M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Santel. & Hommers. **Revista Brasil Bot.** [s.l.]. v. 25, n. 4, p. 397-403, 2002.

O'SULLIVAN, L.; MURPHY, B.; MCLOUGHLIN, P.; DUGGAN, P.; LAWLOR, P. G.; HUGHES, H.; GARDINER, G. E. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. **Mar Drugs.** [s.l.]. v. 8, n. 7, p. 2038-2064, 2010.

PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities of carrageenan. *In*: KIM, S. K. (Ed.). **Advances in food and nutrition research (v. 73)**. Marine carbohydrates: Fundamentals and applications, Part A. Cambridge, MA, Estados Unidos: Academic Press, 2014.

PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Neuroprotective effects of marine algae. **Mar Drugs.** [s.l.]. v. 9, n. 5, p. 803-818, 2011.

PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S. K.; TARTAKOFF, A.; DEVIREDDY, L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. **Biochemistry.** [s.l.]. v. 51, n. 29, p. 5705-5724, 2012.

PEREIRA, J. G.; MESQUITA, J. X.; ARAGÃO, K. S.; FRANCO, A. X.; SOUZA, M. H.; BRITO, T. V.; DIAS, J. M.; SILVA, R. O.; MEDEIROS, J. V. R.; OLIVEIRA, J. S.; ABREU, C. M.; DE PAULA, R. C.; BARBOSA, A. L.; FREITAS, A. L. P. Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 108, p. 17-25, 2014.

PEREIRA, L.; AMADO, A. M.; CRITCHLEY, A. T.; VAN DE VELDE, F.; RIBEIRO-CLARO, P. J. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). **Food Hydrocoll.** [s.l.]. v. 23, n. 7, p. 1903-1909, 2009.

PEREIRA, L.; GHEDA, S. F.; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. **Int J Carbohydr Chem.** [s.l.]. v. 2013, p. 1-7, 2013.

PEREIRA, L. P.; da SILVA, R. O.; BRINGEL, P. H. D. S. F.; da SILVA, K. E. S.; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. **J Ethnopharmacol.** [s.l.]. v. 139, n. 2, p. 642-648, 2012.

PEREIRA-LEITE, C.; NUNES, C.; REIS, S. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: *in vitro* assessment and relevance for their biological actions. **Prog Lipid Res.** [s.l.]. v. 52, n. 4, p. 571-584, 2013.

PEREZ-RECALDE, M.; CANELÓN, D. J.; COMPAGNONE, R. S.; MATULEWICZ, M. C.; CERESO, A. S.; CIANCIA, M. Carrageenan and agaran structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 136, p. 1370-1378, 2016.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem.** [s.l.]. v. 97, p. 55-74, 2015.

POMIN, V. H. Anticoagulant motifs of marine sulfated glycans. **Glycoconj J.** [s.l.]. v. 31, n. 5, p. 341-344, 2014.

POMIN, V. H. Fucanomics and galactanomics: Marine distribution, medicinal impact, conceptions, and challenges. **Mar Drugs.** [s.l.]. v. 10, n. 4, p. 793-811, 2012.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology.** [s.l.]. v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 2008.

POMIN, V. H.; SHARP, J. S.; LI, X.; WANG, L.; PRESTEGARD, J. H. Characterization of glycosaminoglycans by ¹⁵N NMR spectroscopy and *in vivo* isotopic labeling. **Anal Chem.** [s.l.]. v. 82, n. 10, p. 4078-4088, 2010.

PRADO-FERNÁNDEZ, J.; RODRIGUEZ-VÁZQUEZ, J. A.; TOJO, E.; ANDRADE, J. M. Quantitation of κ-, ι- and λ-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Anal Chim Acta.** [s.l.]. v. 480, n. 1, p. 23-37, 2003.

PRAJAPATI, V. D.; MAHERIYA, P. M.; JANI, G. K.; SOLANKI, H. K. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydr Polym.** [s.l.]. v. 105, p. 97-112, 2014.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem.** [s.l.]. v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J Agric Food Chem.** [s.l.]. v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PUJOL, C. A.; RAY, S.; RAY, B.; DAMONTE, E. B. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. **Int J Biol Macromol.** [s.l.]. v. 51, n. 4, p. 412-416, 2012.

QI, H.; SHENG, J. The antihyperlipidemic mechanism of high sulfate content ulvan in rats. **Mar Drugs.** [s.l.]. v. 13, n. 6, p. 3407-3421, 2015.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

REES, D. A. Enzymic synthesis of 3:6-anhydro-L-galactose within porphyran from L-galactose 6-sulphate units. **Biochem J.** [s.l.]. v. 81, n. 2, p. 347, 1961.

RIBEIRO, C. V. P. E. **Estrutura e atividade antidiarreica de polissacarídeos da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* S. G. Gmelin.** 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology.** [s.l.]. v. 77, n. 4, p. 761-767, 1979.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. **Bot Mar.** [s.l.]. v. 29, n. 4, p. 335-340, 1986.

RUDTANATIP, T.; ASUVAPONGPATANA, S.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; WONGPRASERT, K. Sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* target the envelope proteins of white spot syndrome virus and protect against viral infection in shrimp haemocytes. **J Gen Virol.** [s.l.]. v. 95, n. 5, p. 1126-1134, 2014.

RUPÉREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J. A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **J Agric Food Chem.** [s.l.]. v. 50, n. 4, p. 840-845, 2002.

SANGHVI, A. M.; LO, Y. M. Present and potential industrial applications of macro- and microalgae. **Recent Pat Food Nutr Agric.** [s.l.]. v. 2, n. 3, p. 187-194, 2010.

SANTELICES, B.; HOMMERSAND, M. Pterocliadiella, a new genus in the Gelidiaceae (Gelidiales, Rhodophyta). **Phycologia.** [s.l.]. v. 36, n. 2, p. 114-119, 1997.

SCHEIMAN, J. M. NSAID-induced gastrointestinal injury: A focused update for clinicians. **J Clin Gastroenterol.** [s.l.]. v. 50, n. 1, p. 5-10, 2016.

SCHIEBER, M., CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol.** [s.l.]. v. 24, n. 10, p. 453-462, 2014.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** [s.l.]. v. 25, p. 192-205, 1968.

SEKKAL, M.; LEGRAND, P. A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500-100 cm⁻¹ spectral range. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.** [s.l.]. v. 49, n. 2, p. 209-221, 1993.

SENTHILKUMAR, K.; MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; KIM, S. K. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **Int J Biol Macromol.** [s.l.]. v. 60, p. 366-374, 2013.

SIBILIA, V.; RINDI, G.; PAGANI, F.; RAPETTI, D.; LOCATELLI, V.; TORSELLO, A., CAMPANINI, N.; DEGHENGI, R.; NETTI, C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. **Endocrinology.** [s.l.]. v. 144, n. 1, p. 353-359, 2003.

SIDAHMED, H. M. A.; AZIZAN, A. H. S.; MOHAN, S.; ABDULLA, M. A.; ABDELWAHAB, S. I.; TAHA, M. M. E.; HADI, A. H.; KETULY, K. A.; HASHIM, N. M.; LOKE, M. F.; VADIVELU, J. Gastroprotective effect of desmosdumotin C isolated from *Mitrella kentii* against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhage in rats: possible involvement of glutathione, heat-shock protein-70, sulfhydryl compounds, nitric oxide, and anti-*Helicobacter pylori* activity. **BMC Complement Altern Med.** [s.l.]. v. 13, n. 1, p. 183, 2013.

SIDDIQUE, O.; OVALLE, A.; SIDDIQUE, A. S.; MOSS, S. F. *Helicobacter pylori* infection: an update for the internist in the age of increasing global antibiotic resistance. **Am J Med.** [s.l.]. v. 131, n. 5, p. 473-479, 2018.

SIEGMUND, S. V.; HAAS, S.; SINGER, M. V. Animal models and their results in gastrointestinal alcohol research. **Dig Dis.** [s.l.]. v. 23, n. 3-4, p. 181-194, 2005.

SILVA, A. C.; FERREIRA, L. G.; DUARTE, M. E.; NOSEDA, M. D.; SANCHEZ, E. F.; FULY, A. L. Sulfated galactan from *Palisada flagellifera* inhibits toxic effects of *Lachesis muta* snake venom. **Mar Drugs**. [s.l.]. v. 13, n. 6, p. 3761-3775, 2015.

SILVA, I. S.; NICOLAU, L. A.; SOUSA, F. B.; ARAÚJO, S.; OLIVEIRA, A. P.; ARAÚJO, T. S. L.; SOUZA, L. K. M.; MARTINS, C. S.; AQUINO, P. E. A.; CARVALHO, L. L.; SILVA, R. O.; ROLIM-NETO, P. J.; MEDEIROS, J. V. R. Evaluation of anti-inflammatory potential of aqueous extract and polysaccharide fraction of *Thuja occidentalis* Linn. in mice. **Int J Biol Macromol**. [s.l.]. v. 105, p. 1105-1116, 2017.

SILVA, L. M.; LIMA, V.; HOLANDA, M. L.; PINHEIRO, P. G.; RODRIGUES, J. A.; LIMA, M. E.; BENEVIDES, N. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biol Pharm Bull**. [s.l.]. v. 33, n. 5, p. 830-835, 2010.

SILVA, R. O.; SANTOS, G. M.; NICOLAU, L. A.; LUCETTI, L. T.; SANTANA, A. P.; CHAVES, L. S.; BARROS, F. C.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, M. H. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. **Mar Drugs**. [s.l.]. v. 9, n. 11, p. 2188-2200, 2011.

SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R.; CARVALHO, N. S.; PRUDÊNCIO, R. S.; ARAGÃO, K. S.; GUIMARÃES, M. A.; CAMPOS, S. A.; VÉRAS, L. M.; GODEJOHANN, M.; LEITE, J. R.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **J Nat Prod**. [s.l.]. v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, [s.l.]. v. 28, n. 4, p. 1057-1060, 1989.

SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. [s.l.]. v. 21, n. 1, p. 28-38, 2001.

SOBKO, T.; MARCUS, C.; GOVONI, M.; KAMIYA, S. Dietary nitrate in Japanese traditional foods lowers diastolic blood pressure in healthy volunteers. **Nitric Oxide**. [s.l.]. v. 22, n. 2, p. 136-140, 2010.

SOKOLOVA, R. V.; ERMAKOVA, S. P.; AWADA, S. M.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; KANAAN, H. M. Composition, structural characteristics, and antitumor properties of polysaccharides from the brown algae *Dictyopteris polypodioides* and *Sargassum* sp. **Chem Nat Compd**. [s.l.]. v. 47, n. 3, p. 329-334, 2011.

- SØREIDE, K.; THORSEN, K.; HARRISON, E. M.; BINGENER, J.; MØLLER, M. H.; OHENE-YEBOAH, M.; SØREIDE, J. A. Perforated peptic ulcer. **The Lancet**. [s.l.]. v. 386, n. 10000, p. 1288-1298, 2015.
- SOUSA, A. A.; BENEVIDES, N. M. B.; FREITAS, A. P.; FIÚZA, F. P.; QUEIROZ, M. G.; MORAIS, T. M.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Fundam Clin Pharmacol**. [s.l.]. v. 27, n. 2, p. 173-180, 2013.
- SOUSA, W. M.; SILVA, R. O.; BEZERRA, F. F.; BINGANA, R. D.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E. C.; SOMBRA, V. G.; SOARES, P. M. G.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, A. L. P. (2016). Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydr Polym**. [s.l.]. v. 152, p. 140-148, 2016.
- SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; TEIXEIRA, J. A.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocoll**. [s.l.]. v. 27, n. 2, p. 287-292, 2012.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **J Biosci Bioeng**. [s.l.]. v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.
- SREBRO, D. P.; VUČKOVIĆ, S.; MILOVANOVIĆ, A.; VUJOVIĆ, K. S.; VUČETIĆ, Č.; PROSTRAN, M. Preventive treatment with dizocilpine attenuates oedema in a carrageenan model of inflammation: the interaction of glutamatergic and nitrenergic signaling. **Inflammopharmacology**. [s.l.]. v. 27, n. 1, p. 121-128, 2019.
- STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**. [s.l.]. v. 29, n. 5, p. 483-501, 2011.
- SUDHARSAN, S.; GIJI, S.; SEEDEVI, P.; VAIRAMANI, S.; SHANMUGAM, A. Isolation, characterization and bioactive potential of sulfated galactans from *Spyridia hypnoides* (Bory) Papenfuss. **Int J Biol Macromol**. [s.l.]. v. 109, p. 589-597, 2018.
- TEAS, J.; IRHIMEH, M. R. Melanoma and brown seaweed: an integrative hypothesis. **J Appl Phycol**. [s.l.]. v. 29, n. 2, p. 941-948, 2017.

THOMAS, D. T.; FRESHWATER, D. W. Studies of Costa Rican Gelidiales (Rhodophyta): four Caribbean taxa including *Pterocliadiella beachii* sp. nov. **Phycologia**. [s.l.]. v. 40, n. 4, p. 340-350, 2001.

TOMITANI, A.; OKADA, K.; MIYASHITA, H.; MATTHIJS, H. C.; OHNO, T.; TANAKA, A. Chlorophyll *b* and phycobilins in the common ancestor of cyanobacteria and chloroplasts. **Nature**. [s.l.]. v. 400, n. 6740, p. 159-162, 1999.

TURNLUND, J. R.; FRIBERG, L. T. Molybdenum. *In*: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. (Eds.). **Handbook on the toxicology of metals**, 4. ed. Cambridge, MA, Estados Unidos: Academic Press, 2007.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**. [s.l.]. v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

UEDA, J. I.; SAITO, N.; SHIMAZU, Y.; OZAWA, T. A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. **Arch Biochem Biophys**. [s.l.]. v. 333, n. 2, p. 377-384, 1996.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. L.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. **Trends Food Sci Technol**. [s.l.]. v. 13, n. 3, p. 73-92, 2002.

VANDERLEI, E. D. S. O.; DE ARAÚJO, I. W. F.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; ELOY, Y. R. G.; RODRIGUES, J. A. G.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; MENEZES, D. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflamm Res**. [s.l.]. v. 60, n. 12, p. 1121-1130, 2011.

VERGARA-RODARTE, M. A.; HERNÁNDEZ-CARMONA, G.; RODRÍGUEZ-MONTESINOS, Y.; E.; ARVIZU-HIGUERA, D. L.; RIOSMENA-RODRÍGUEZ, R.; MURILLO-ÁLVAREZ, J. I. Seasonal variation of agar from *Gracilaria vermiculophylla*, effect of alkali treatment time, and stability of its Colagar. **J Appl Phycol**. [s.l.]. v. 22, n. 6, p. 753-759, 2010.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**. [s.l.]. v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VIGOR, C.; REVERSAT, G.; ROCHER, A.; OGER, C.; GALANO, J. M.; VERCAUTEREN, J.; DURAND, T.; TONON, T.; LEBLANC, C.; POTIN, P. Isoprostanoids quantitative profiling of marine red and brown macroalgae. **Food Chem**. [s.l.]. v. 268, p. 452-462, 2018.

VINNITSKIY, D. Z.; KRYLOV, V. B.; USTYUZHANINA, N. E.; DMITRENOK, A. S.; NIFANTIEV, N. E. The synthesis of heterosaccharides related to the fucoidan from *Chordaria flagelliformis* bearing an α -l-fucofuranosyl unit. **Org Biomol Chem.** [s.l.]. v. 14, n. 2, p. 598-611, 2016.

WHYTE, J. N. C.; HOSFORD, S. P. C.; ENGLAR, J. R. Assignment of agar or carrageenan structures to red algal polysaccharides. **Carbohydr Res.** [s.l.]. v. 140, n. 2, p. 336-341, 1985.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med.** [s.l.]. v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

WONGPRASERT, K.; RUDTANATIP, T.; PRAIBOON, J. Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. **Fish Shellfish Immunol.** [s.l.]. v. 36, n. 1, p. 52-60, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health 2018.** World Health Organization, 2019.

WU, B. Y.; LIU, C. T.; SU, Y. L.; CHEN, S. Y.; CHEN, Y. H.; TSAI, M. Y. A review of complementary therapies with medicinal plants for chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Complement Ther Med.** [s.l.]. v. 42, p. 226-232, 2019.

WU, Q. H.; WANG, X.; YANG, W.; NÜSSLER, A. K.; XIONG, L. Y.; KUČA, K., DOHNAL, V.; ZHANG, X. J.; YUAN, Z. H. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. **Arch Toxicol.** [s.l.]. v. 88, n. 7, p. 1309-1326, 2014.

YANG, Y.; LIU, D.; WU, J.; CHEN, Y.; WANG, S. *In vitro* antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. **Int J Biol Macromol.** [s.l.]. v. 49, n. 5, p. 1031-1037, 2011.

YU, Y.; CUI, Y.; NIEDERNHOFER, L. J.; WANG, Y. Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress-induced DNA damage. **Chem Res Toxicol.** [s.l.]. v. 29, n. 12, p. 2008-2039, 2016.

YUN, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. **Phytochemistry.** [s.l.]. v. 71, n. 14-15, p. 1625-1641, 2010.

ZHANG, B. B.; LI, Y.; LIU, X. Q.; WANG, P. J.; YANG, B.; BIAN, D. L. Association between vacA genotypes and the risk of duodenal ulcer: a meta-analysis. **Mol Biol Rep.** [s.l.]. v. 41, n. 11, p. 7241-7254, 2014.

ZHANG, Q.; LI, N.; LIU, X.; ZHAO, Z.; LI, Z.; XU, Z. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its *in vivo* antioxidant activity. **Carbohydr Res.** [s.l.]. v. 339, n. 1, p. 105-111, 2004.

ZHANG, Z.; ZHANG, Q.; WANG, J.; ZHANG, H.; NIU, X.; LI, P. Preparation of the different derivatives of the low-molecular-weight porphyran from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant activities *in vitro*. **Int J Biol Macromol.** [s.l.]. v. 45, n. 1, p. 22-26, 2009.

ZHANG, Z.; ZOU, Y. Y.; LI, F. J.; HU, C. P. Asymmetric dimethylarginine: A novel biomarker of gastric mucosal injury? **World J Gastroenterol.** [s.l.]. v. 17, n. 17, p. 2178, 2011.

ZHENG, H.; BEAMER, S. K.; MATAK, K. E.; JACZYNSKI, J. Effect of κ -carrageenan on gelation and gel characteristics of Antarctic krill (*Euphausia superba*) protein isolated with isoelectric solubilization/precipitation. **Food Chem.** [s.l.]. v. 278, p. 644-652, 2019.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. *In vivo* antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacol Res.** [s.l.]. v. 50, n. 1, p. 47-53, 2004.

ANEXO A - CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da toxicidade aguda e crônica do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Pterocladia beachiae freshwater*”, protocolo 138/17, sob responsabilidade da Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 22 de fevereiro de 2018.

Vigência do projeto	01/01/18 – 30/09/18
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss
Nº de Animais	21
Peso	20 – 25 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UFC
Vigência do projeto	01/01/18 – 30/09/18
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de Animais	16
Peso	200 – 250 g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da UFC

fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE