



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

ANA PAULA CAVALCANTE CÉSAR

ESTUDO QUÍMICO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE
***IN VIVO* DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA RODOFÍCEA**
***Cryptonemia crenulata* (J. Agardh)**

FORTALEZA
2022

ANA PAULA CAVALCANTE CÉSAR

ESTUDO QUÍMICO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO* DOS
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA RODOFÍCEA *Cryptonemia crenulata* (J. Agardh)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

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

Coorientador: Prof. Dr. Glauber Cruz Lima.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C414e César, Ana Paula Cavalcante.
Estudo químico estrutural e avaliação da toxicidade in vivo dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Cryptonemia crenulata* (J. Agardh) / Ana Paula Cavalcante César. – 2022.
88 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.
Coorientação: Prof. Dr. Glauber Cruz Lima.
1. Polímeros. 2. Galactanas DL-híbridas. 3. Molécula atóxica. 4. Dano oxidativo. 5. Potencial antioxidante. I. Título.

CDD 572

ANA PAULA CAVALCANTE CÉSAR

ESTUDO QUÍMICO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO* DOS
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA RODOFÍCEA *Cryptonemia crenulata* (J. Agardh)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 28/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Glauber Cruz Lima (Coorientador)
Centro Universitário INTA (UNINTA)

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por ser tão presente em minha vida e permitir que eu tenha saúde, discernimento, acesso à educação e ao básico que uma grande maioria não tem oportunidade, diante tantas desigualdades. Sinto que sou privilegiada!

À minha mãe linda, Fátima Cavalcante, que amo demais, maravilhosa e de uma essência, caráter tão singular e especial. Ao meu pai, meu amado Florentino César, *in memoriam*, que faz tanta falta e amarei para sempre. A eles, devo tudo que sou.

Aos meus irmãos Flávio César, João Paulo César, Kleuton César, Wagner César e respectivas famílias, pelos bons momentos vividos. À minha tia Lúcia Cavalcante, que apesar da distância física, é presente continuamente em minha vida e torce por mim de verdade. Aos tios (as) e primos (as) que demonstram um sentimento verdadeiro de carinho e amizade.

À minha orientadora Profa. Ana Lúcia Ponte Freitas, pelos ensinamentos, orientação nesse estudo, por ter sido tão receptiva, acolhedora no seu laboratório e pela compreensão com meus horários um tanto conturbados. Muita gratidão!

Ao meu coorientador Prof. Glauber Cruz Lima, também pelo direcionamento e orientação nessa dissertação. Além do mais, pela paciência com minha ansiedade e nervosismo.

Aos membros da banca examinadora, os professores Ana Lúcia Ponte Freitas, Cleverson Diniz Teixeira de Freitas, Glauber Cruz Lima e Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro, pela disponibilidade e pelas sugestões para o enriquecimento desse trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Algas Marinhas, Francisco Diêgo e Gabriel Cândido, pela parceria e pelas situações engraçadas nos dias de coleta. À Poliana Alencar, pelas conversas descontraídas. Aos professores que participaram de minha trajetória, com contribuição significativa ao meu conhecimento. Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela presteza e dedicação.

Ao Laboratório de Polímeros da UFC, especialmente Profa. Regina Célia pela relevante colaboração. Ao colega Venícios Sombra, por ter participado no meu processo de indicação ao Laboratório de Algas e pela valiosa contribuição na execução em alguns ensaios. Aos demais membros, especialmente Aline (principalmente), Raele, Ramon, Vanessa e aos outros pela cordialidade.

Ao Prof. Renan Damasceno, pela parceria e valorosa colaboração nos ensaios de toxicidade do material de pesquisa.

Às duas colegas de trabalho Débora Hellen e Nadia Aline, que se mostraram amigas e muito empenhadas em auxiliar e viabilizar em alguns experimentos durante esse processo de

execução da dissertação. À minha colega de mestrado Fernanda Azevedo, por estar bem presente e disposta a ajudar. Gratidão!

Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, pela convivência da necessidade de minha ausência parcial. Aos meus colegas de trabalho que se fizeram presentes e contribuíram de alguma forma, Ana Paula Oliveira, Elis Cristina, Gilda Luiza, Herbert Magalhães, Iracema Moreira, Janete Magalhães, Josimeire Gomes, Kaline Rodrigues, Thiago Teixeira e, em especial, Marlene Martins, pela sua solicitude de sempre. A Conceição Alves, pela ajuda em itens importantes.

Às minhas amigas Dreyce Prado, Liesly Oliveira, Valéria Mourão e Vanuza Ribeiro, pelas melhores conversas possíveis e lealdade.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

RESUMO

As algas marinhas vermelhas (rodofíceas) são fontes naturais de polissacarídeos sulfatados que vêm despertando o interesse da indústria farmacêutica devido seus vários efeitos biológicos, muitos deles já descritos na literatura, tais como antioxidante, anticoagulante, anti-inflamatório, antidiarreico e gastroprotetor. Este estudo teve como objetivo isolar os polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Crytonemia crenulata* (PS-Cc), caracterizar sua estrutura química, investigar toxicidade aguda *in vivo* e atividade antioxidante *in vitro*. Os PS-Cc obtidos por meio de digestão enzimática com papaína apresentaram grau de sulfatação de 1,44 com massa molar numérica média de $3,18 \times 10^5$ g/mol. Além disso, os PS-Cc mostraram conteúdo de carboidratos totais de 71,43% e níveis de carbono (25,31%), enxofre (5,48%) e hidrogênio (8,08%) através da microanálise. A caracterização estrutural foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton (^1H) e ^{13}C -DEPT 135, permitindo identificar os PS-Cc por galactanas do tipo D/L híbridas. A avaliação da toxicidade aguda foi realizada em camundongos via oral por gavagem, de acordo com a diretriz 423 da OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) e através do screening hipocrático. Em ambos os testes, os animais foram divididos em grupo tratado, que recebeu dose única de 2000 mg/kg dos PS-Cc, e grupo controle, sendo monitorados por 14 dias. Os animais não apresentaram sinais tóxicos relacionados à administração do tratamento nem mostraram alterações importantes no peso do corpo e dos órgãos. O grupo tratado não apresentou mudanças significativas nos parâmetros relacionados à função hepática; albumina, ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e ALP (fosfatase alcalina), função renal (creatinina e ureia) e perfil de glicose/lipídico. Ademais, a dosagem dos PS-Cc não induziu quaisquer sinais adversos aparentes na autonomia, comportamento, perfis neurológicos gerais e nem causou morte em nenhum animal. A atividade antioxidante *in vitro* dos PS-Cc foi avaliada através do ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH), atividade quelante do íon ferroso e capacidade antioxidante total, com respectivos resultados de 52,6%, 51,03% e 58,97%, o que demonstrou um considerável efeito antioxidante. Os resultados sugerem que os PS-Cc apresentaram caráter atóxico e podem ser um candidato em potencial para exercer algum tipo de atividade biológica.

Palavras-chave: Polímeros; galactanas DL-híbridas; molécula atóxica; dano oxidativo; potencial antioxidante.

ABSTRACT

Red seaweeds (rhodophytes) are natural sources of sulfated polysaccharides that have been attracting the interest of the pharmaceutical industry due to their several biological effects, many of them already described in the literature, such as antioxidant, anticoagulant, anti-inflammatory, antidiarrheal and gastroprotective. This study aimed to isolate sulfated polysaccharides from the rhodophyte *Cryptonemia crenulata* (PS-Cc), characterize its chemical structure, and investigate acute toxicity in vivo and antioxidant activity in vitro. The PS-Cc obtained by enzymatic digestion with papain showed a degree of sulfation of 1.44 with an estimated molar mass of 3.18×10^5 g/mol. In addition, PS-Cc showed total carbohydrate content of 71.43% and levels of carbon (25.31%), sulfur (5.48%), and hydrogen (8.08%) via microanalysis. Structural characterization was performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of proton (^1H) and ^{13}C -DEPT 135, allowing to identify PS-Cc by hybrids D/L type galactans. Acute toxicity assessment was performed in mice according to OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) guideline 423 and by the Hippocratic screening method. In both tests, the animals were separated into two groups monitored for 14 days: a treated group, which received a single dose of 2000 mg/kg of PS-Cc, and a control group. The animals did not show toxic signs related to the administration of the treatment, nor did they present significant differences in body and organ weights. The treated group did not show significant differences in parameters related to liver function; albumin, ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), and ALP (alkaline phosphatase), renal function (creatinine and urea), and glucose/lipid profile. Also, the PS-Cc dosage did not induce any apparent adverse signs in autonomy, behavior, or general neurological profiles, nor did it cause death in any animal. The in vitro antioxidant activity of PS-Cc was evaluated through the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, ferrous ion chelating activity, and total antioxidant capacity, with results of 52.6%, 51.03% and 58.97%, respectively, demonstrating a considerable antioxidant effect. The results suggest that PS-Cc had a non-toxic character and may be a potential candidate to assess some biological activity.

Keywords: Polymers; DL-hybrids galactans; non-toxic molecule; oxidative damage; antioxidant potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática estrutural das galactanas sulfatadas de algas vermelhas	21
Figura 2 – Estruturas químicas de unidades repetitivas de ágar	22
Figura 3 – Representação das três principais carragenanas encontradas em algas vermelhas	23
Figura 4 – Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha <i>Crytonemia crenulata</i> e sua classificação taxonômica	32
Figura 5 – Perfil cromatográfico dos PS-Cc em cromatografia de permeação em gel (GPC)	43
Figura 6 – Espectro de absorção na região do infravermelho dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>Crytonemia crenulata</i>	45
Figura 7 – Espectro de ¹³ C-DEPT dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>Crytonemia crenulata</i>	47
Figura 8 – Espectro de RMN de ¹ H dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>Crytonemia crenulata</i>	48
Figura 9 – Peso corporal dos camundongos do grupo controle/tratado com solução dos PS-Cc	50
Figura 10 – Peso relativo dos órgãos dos camundongos do grupo controle/tratado com solução dos PS-Cc	51
Figura 11 – Ilustração da macroscopia dos órgãos	52
Figura 12 – Concentração de albumina (g/dL)	53
Figura 13 – Concentração de ALT (U/L)	54
Figura 14 – Concentração de AST (U/L)	54
Figura 15 – Concentração de ALP (U/L)	55
Figura 16 – Concentração de creatinina (mg/dL)	56
Figura 17 – Concentração de ureia (mg/dL)	57
Figura 18 – Concentração de colesterol total (mg/dL)	58

Figura 19 – Concentração de glicose (mg/dL)	59
Figura 20 – Estabilização do radical livre 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH)	62
Figura 21 – Efeito dos PS-Cc no sequestro do radical DPPH	63
Figura 22 – Efeito dos PS-Cc na atividade quelante do íon ferroso	65
Figura 23 – Efeito dos PS-Cc na capacidade antioxidante total	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Análises bioquímicas dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. crenulata</i>	44
Tabela 2	– Variação do peso corporal do grupo controle/tratado com solução dos PS-Cc	50
Tabela 3	– Variação do peso relativo dos órgãos do grupo controle/tratado com solução dos PS-Cc	51
Tabela 4	– Perfil de função hepática do grupo controle/tratado com solução dos PS-Cc	55
Tabela 5	– Teste de função renal do grupo controle/tratado com solução dos PS-Cc	56
Tabela 6	– Perfil lipídico e glicêmico do grupo controle/tratado com solução dos PS-Cc	57
Tabela 7	– Parâmetros influenciadores na atividade motora	60
Tabela 8	– Parâmetros influenciadores no Sistema sensorial	61
Tabela 9	– Parâmetros influenciadores no Sistema Nervoso Central	61
Tabela 10	– Parâmetros influenciadores no Sistema Nervoso Autônomo	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
DS	Grau de sulfatação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura
GHS	Sistema Globalmente Harmonizado para a Classificação de Substâncias Químicas e Misturas
IVTF	Infravermelho com transformada de Fourier
DL ₅₀	Dose letal
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PG	Propilgalato
PLS	Polissacarídeos sulfatados
PS-Cc	Polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha <i>C. crenulata</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SNC	Sistema Nervoso Central
Sofia	State of The World Fisheries and Aquaculture
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TGO	Transaminase oxalacética

TGP	Transaminase pirúvica
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Algas	18
2.2	Polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas	19
2.2.1	<i>Galactanas sulfatadas</i>	21
2.2.1.1	<i>Agaranas</i>	21
2.2.1.2	<i>Carragenanas</i>	23
2.3	Propriedades biológicas dos polissacarídeos sulfatados	24
2.4	Toxicidade	25
2.5	Estresse oxidativo	26
2.6	A espécie <i>Cryptonemia crenulata</i>	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MATERIAIS	32
4.1	Algas	32
4.2	Animais	32
5	MÉTODOS	34
5.1	Digestão enzimática dos polissacarídeos sulfatados	34
5.2	Rendimento	34
5.3	Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. crenulata</i>	34
5.3.1	<i>Determinação do conteúdo de carboidratos</i>	34
5.3.2	<i>Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes</i>	35
5.3.3	<i>Determinação do conteúdo de sulfato</i>	35
5.4	Caracterização químico-estrutural polissacarídeos sulfatados da <i>C. crenulata</i>	36
5.4.1	<i>Cromatografia de permeação em gel</i>	36
5.4.2	<i>Análise elementar</i>	36
5.4.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	37
5.4.4	<i>Espectroscopia por Ressonância Magnética</i>	37
5.5	Toxicidade aguda <i>in vivo</i> dos PS-Cc	37

5.5.1	<i>Protocolo 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico</i>	37
5.5.2	<i>Screening hipocrático</i>	38
5.6	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos polissacarídeos sulfatados da <i>Cryptonemia crenulata</i>	38
5.6.1	<i>Ensaio de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH)</i>	38
5.6.2	<i>Ensaio de atividade quelante do íon ferroso</i>	39
5.6.3	<i>Ensaio de capacidade antioxidante total</i>	39
5.7	Análise estatística	40
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1	Obtenção e rendimento dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. crenulata</i>	41
6.2	Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. crenulata</i>	41
6.2.1	<i>Quantificação do conteúdo de carboidratos totais</i>	41
6.2.2	<i>Quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes</i>	42
6.2.3	<i>Quantificação do conteúdo de sulfato</i>	42
6.3	Caracterização químico-estrutural dos polissacarídeos sulfatados da <i>C. crenulata</i>	43
6.3.1	<i>Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel</i>	43
6.3.2	<i>Quantificação do conteúdo de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre</i>	44
6.3.3	<i>Determinação da estrutura química por espectroscopia de absorção na região do infravermelho</i>	44
6.3.4	<i>Determinação da estrutura química por ressonância magnética nuclear</i>	46
6.4	Toxicidade aguda <i>in vivo</i> dos PS-Cc	48
6.4.1	<i>Protocolo 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico</i>	49
6.4.1.1	<i>Peso corporal e peso dos órgãos</i>	49
6.4.1.2	<i>Análises bioquímicas</i>	52
6.4.1.2.1	Função hepática: albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP)	52
6.4.1.2.2	Função renal: creatinina e ureia	55
6.4.1.2.3	Perfil de glicose e lipídico: glicose sanguínea e colesterol total	57
6.4.2	<i>Screening hipocrático</i>	59
6.4.2.1	<i>Efeitos na atividade motora e Sistema sensorial</i>	60

6.4.2.2	<i>Efeitos no Sistema Nervoso Central</i>	61
6.4.2.3	<i>Efeitos no Sistema Nervoso Autônomo</i>	61
6.5	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos PS-Cc	62
6.5.1	<i>Ensaio de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH)</i>	62
6.5.2	<i>Ensaio de atividade quelante do íon ferroso</i>	64
6.5.3	<i>Ensaio de capacidade antioxidante total</i>	65
7	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69