



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

TALITA DE SOUZA DE ALCÂNTARA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO
NEUROPROTETOR DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA
Asparagopsis armata Harvey EM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM
RATOS**

FORTALEZA

2023

TALITA DE SOUZA DE ALCÂNTARA LIMA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO
NEUROPROTETOR DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA
Asparagopsis armata Harvey EM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Norma Maria Barros Benevides

FORTALEZA

2023

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)

- L711c Lima, Talita de Souza de Alcântara.
Caracterização química estrutural e avaliação do efeito neuroprotetor de polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Asparagopsis armata* Harvey em modelo de doença de Parkinson em ratos / Talita de Souza de Alcântara Lima. – 2023.
98 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
1. Cirurgia estereotaxica. 2. Galactanas sulfatadas híbridas. 3. Neuroproteção. I.
Título.

CDD 572

TALITA DE SOUZA DE ALCÂNTARA LIMA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO EFEITO
NEUROPROTETOR DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA
Asparagopsis armata Harvey EM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS

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

Aprovada em: 14/03/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Kirley Marques Canuto
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Ao autor da minha vida, Deus!

Meu esposo Wellisson Pires Lima por todo apoio.

Minha família pela grande força concedida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor da vida, agradeço pela saúde, força e coragem depositadas em mim durante a execução desse trabalho. A Ele toda glória e honra para sempre. Amém.

À Professora Dr^a. Norma Maria Barros Benevides, agradeço por me acolher em seu laboratório de maneira tão especial. Sempre que precisei, não mediu esforços para me ajudar na execução desse trabalho. Sou grata por todo cuidado e pelos ensinamentos obtidos.

À Professora Dr^a. Judith Pessoa de Andrade Feitosa do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, agradeço pela autorização da realização das técnicas de caracterização dos polissacarídeos sulfatados.

Ao Dr. Kirley Marques Canuto do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), por permitir a realização da caracterização dos polissacarídeos sulfatados, à qual foi executada pela Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva.

À Professora Dr^a. Arcelina Pacheco Cunha, pelas orientações a mim concedidas por meio de sua vasta experiência com polissacarídeos sulfatados.

Ao Professor Dr. Hermógenes David de Oliveira pelo acolhimento no Laboratório de Química Medicinal do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM-UFC), o qual foi fundamental para o desenvolvimento das dosagens neuroquímicas.

À Dr^a. Annyta Fernandes Frota por todo aprendizado no modelo experimental *in vivo* da Doença de Parkinson.

Ao Dr. José Ariévilto Gurgel Rodrigues, por todo conhecimento transmitido ao longo desse processo.

À Professora Dr^a. Ticiania Monteiro Abreu, agradeço pela orientação e disponibilidade na execução desse manuscrito.

Ao meu colega Francisco Ewerton de Sousa Lima, por toda ajuda prestada nas dosagens químicas dos polissacarídeos sulfatados.

Agradeço ao Dr. Rui Felipe Pinto Pedrosa, coordenador em Peniche-Leiria-Portugal do projeto “CROSS-ATLANTIC-Creating Opportunities from Seaweed Sulfated polysaccharides for Application in Therapeutics” em parceria com a Dr^a Norma Maria Barros Benevides coordenadora do referido projeto em Fortaleza-Ceará-Brasil, pelo envio de algumas espécies de algas marinhas da Costa litorânea de Portugal, onde a espécie *Asparagopsis armata* foi utilizada nas atividades das pesquisas *in vitro* e *in vivo* desse trabalho. Agradeço também ao

pesquisador do projeto em Portugal, Celso Miguel de Maia Alves, por algumas sugestões para a realização das atividades de pesquisa *in vivo*.

Agradeço a empresa do Biotério Central (Biotec) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC (NPDM-UFC), local onde realizei meus experimentos *in vivo* e em especial à gestora Marta Lorena Speck da Silva por sempre estar disponível para nos atender nas demandas de animais.

À Veterinária Gabriela Mariângela Farias de Oliveira pelas monitorias e ensino nas práticas experimentais com os animais.

Agradeço aos técnicos Alisson Silva Chaves, Dayvson Daniel Andrade de Menezes e Nailson Moreira Lima por todo apoio e auxílio prestado no decorrer dos meus experimentos *in vivo*, foi um enorme prazer trabalhar com toda essa equipe prestativa e responsável.

Aos animais, que regeram todo esse processo experimental. Lamento o sacrifício de cada um de vocês.

Agradeço imensamente aos bolsistas de Iniciação Científica Damares da Silva Nogueira, João Ricardo Gomes Pereira, David Pereira Raquel, que estiveram me auxiliando durante a realização dos experimentos com os animais.

Aos meus colegas do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec-UFC) Débora Cavalcante dos Santos, Marla Jayssa Corrêa da Silva e Ana Joyce Oliveira Silva, por todos os momentos de ajuda, estudos e diversão no decorrer dessa caminhada.

Por fim, agradeço ao meu querido esposo Wellisson Pires Lima, minha mãe Maria de Souza de Alcântara e meus sogros Francisco Ferreira Lima Filho e Eulimar Pires Lima pela força, e ânimo nos meus momentos de fraqueza. Amo vocês!

Agradeço a Universidade Federal do Ceará (UFC), a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP. Processo: FCT-00141-00006.01.00/18 por ter financiado essa pesquisa e ao CNPQ pela bolsa que me foi concedida.

"Quanto mais estudo a natureza, mais fico
impressionado com a obra do Criador."

Louis Pasteur

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos localizados na substância nigra *pars compacta* (SNpc), o que promove uma série de sintomas motores e não motores. A levodopa ainda é o principal medicamento utilizado na terapia atual. No entanto, o uso contínuo tem ocasionado efeitos colaterais, tais como a tolerância e flutuações motoras. A busca por novas fontes terapêuticas, como as algas marinhas, tem aumentado nos últimos anos devido às suas riquezas de compostos naturais. A *Asparagopsis armata* Harvey é uma alga marinha Rhodophyta portuguesa que possui diversos compostos bioativos, dentre eles os polissacarídeos sulfatados (PS). Esses polissacarídeos têm despertado grande interesse nas pesquisas devido à sua vasta aplicação em atividades biológicas, como anticoagulante, antioxidante, anti-inflamatório, imunomodulador e neuroprotetor. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar a estrutura química dos polissacarídeos sulfatados de *A. armata* Harvey (PST-Aa) e investigar os efeitos neuroprotetores em um modelo da DP em ratos induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Para isso, 5/g de alga seca foram submetidas a extração enzimática (6 h; 60°C) com papaína, cujo rendimento de PST-Aa foi de 13,64%. As dosagens químicas dos teores de carboidratos solúveis e sulfatos livres dos PST-Aa apresentaram um rendimento de 53,20%, 30,29%, respectivamente e quanto aos teores de proteínas nos PST-Aa, não foram detectados. A massa molar dos PST-Aa, estimada por eletroforese em gel de agarose a 0,5% foi de 332.7 kDa. Os resultados da caracterização estrutural dos PST-Aa através das técnicas de espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Ressonância magnética nuclear (RMN) demonstraram que os PST-Aa apresentaram estruturas formadas por galactanas híbridas compostas de 3-β-D-galactopiranosose-(1→4)-α-D/L-galactopiranosose. Para avaliação do efeito neuroprotetor dos PST-Aa foram utilizados ratos albinos da raça *Wistar*, com idade 6-9 semanas (250-290 g), os quais foram lesionados no estriado direito por 6-OHDA através de cirurgia estereotaxica. Após 24h, os animais foram tratados 1 vez por dia por gavagem durante 14 dias com as doses de PST-Aa 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg. No 14º dia, 1h após o último dia de tratamento os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Os efeitos neuroprotetores através do teste de campo aberto demonstrou que os PST-Aa nas doses 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg elevou o número de cruzamentos em 32,12% e 21,45% e o número de *rearing* em 83,16% e 100,54% respectivamente. A atividade de *grooming* apresentou redução através das doses 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg em 57,24% e 53,37%, assim como foi reduzido o tempo parado em 40,66% e 40,24% respectivamente. O teste do cilindro demonstrou que os animais tratados com a dose 0,3 mg/kg

e 3,0 mg/kg apresentaram uma maior atividade com a pata ipsilateral em ($41,34 \pm 3,74$ tempo executado) e ($32,11 \pm 4,61$ tempo executado) e ambas as patas ($21,73 \pm 2,86$ tempo executado) e ($32,34 \pm 2,47$ tempo executado) respectivamente. O teste de apomorfina demonstrou que a dose de 3,0 mg/kg conseguiu reduzir o número de rotações contralaterais em 61% comparado ao grupo 6-OHDA. No 15º dia os animais foram decapitados, os encéfalos (corpo estriado ipsilateral e contralateral, hipocampo e córtex pré-frontal). No 15º dia os animais foram decapitados, os encéfalos (corpo estriado ipsilateral e contralateral, hipocampo e córtex pré-frontal) foram removidos e os resultados demonstraram que PST-Aa na dose de 3,0 mg/kg apresentou efeitos antinitrosativos em região do corpo estriado ipsilateral ($24,09 \pm 4,78$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido). Os PST-Aa reduziram a peroxidação lipídica na região do hipocampo através das doses 0,3 mg/kg ($26,98 \pm 0,68$ $\mu\text{Mol MDA}/\text{g}$ de tecido) e 3,0 mg/kg ($27,65 \pm 1,37$ $\mu\text{Mol MDA}/\text{g}$ de tecido) e efeitos antioxidantes por elevar os níveis de GSH na região do corpo estriado contralateral nas doses 0,3 mg/kg ($334,7 \pm 15,13$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido) e 3,0 mg/kg ($306,8 \pm 7,44$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido). Dessa forma, os PST-Aa sugerem novas fontes promissoras no tratamento de desordens neurodegenerativas.

Palavras chave: cirurgia estereotaxica; galactanas sulfatadas híbridas; neuroproteção.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is characterized by the degeneration of dopaminergic neurons located in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc), which leads to a series of motor and non-motor symptoms. Levodopa remains the primary medication used in current therapy. However, continuous use has resulted in side effects such as tolerance and motor fluctuations. The search for new therapeutic sources, such as seaweeds, has increased in recent years due to their richness in natural compounds. *Asparagopsis armata* Harvey is a Portuguese Rhodophyta marine alga that possesses various bioactive compounds, including sulfated polysaccharides (PS). These polysaccharides have generated significant interest in research due to their wide range of biological activities, such as anticoagulant, antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, and neuroprotective effects. Thus, the aim of this study was to characterize the chemical structure of sulfated polysaccharides from *A. armata* Harvey (PST-Aa) and investigate their neuroprotective effects in a rat model of PD induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). For this purpose, 5 g of dried algae were subjected to enzymatic extraction (6 h; 60°C) using papain, with a yield of 13.64% for PST-Aa. The chemical analysis of the soluble carbohydrate and free sulfate contents of PST-Aa showed a yield of 53.20% and 30.29%, respectively, while no protein content was detected in PST-Aa. The molar mass of PST-Aa, estimated by 0.5% agarose gel electrophoresis, was 332.7 kDa. The results of the structural characterization of PST-Aa using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques demonstrated that PST-Aa presented structures composed of hybrid galactans composed of 3-β-D-galactopyranose-(1→4)-α-D/L-galactopyranose. For the evaluation of the neuroprotective effect of PST-Aa, albino Wistar rats, aged 6-9 weeks (250-290 g), were used. They were lesioned in the right striatum with 6-OHDA through stereotaxic surgery. After 24 hours, the animals were treated once daily by gavage for 14 days with doses of PST-Aa at 0.3 mg/kg and 3.0 mg/kg. On the 14th day, 1 hour after the last day of treatment, the animals were subjected to behavioral tests. The neuroprotective effects assessed through the open-field test showed that PST-Aa at doses of 0.3 mg/kg and 3.0 mg/kg increased the number of crossings by 32.92% and 21.47%, and the number of rearing by 83.25% and 100.5%, respectively. The grooming activity was reduced by doses of 0.3 mg/kg and 3.0 mg/kg by 57.28% and 53.47%, respectively, and the time spent motionless was reduced by 40.69% and 59.72%, respectively. The cylinder test demonstrated that animals treated with doses of 0.3 mg/kg and 3.0 mg/kg showed increased activity with the ipsilateral paw at (41.34±3.74 time executed) and (32.11±4.61 time executed), and with both paws at (21.73±2.86) and (32.34±2.47), respectively. The apomorphine test showed that the dose of 3.0

mg/kg was able to reduce the number of contralateral rotations by 61% compared to the 6-OHDA group. On the 15th day, the animals were decapitated, and their brains (including the ipsilateral and contralateral striatum, hippocampus, and prefrontal cortex) were removed. The results demonstrated that PST-Aa at a dose of 3.0 mg/kg showed anti-nitrosative effects in the region of the ipsilateral striatum (24.09 ± 4.78 $\mu\text{g/g}$ tissue). PST-Aa reduced lipid peroxidation in the hippocampus region at doses of 0.3 mg/kg (26.98 ± 0.68 $\mu\text{Mol MDA/g}$ tissue) and 3.0 mg/kg (27.65 ± 1.37 $\mu\text{Mol MDA/g}$ tissue), and exhibited antioxidant effects by elevating GSH levels in the contralateral striatum region at doses of 0.3 mg/kg (334.7 ± 15.13 $\mu\text{M/mg}$ tissue) and 3.0 mg/kg (306.8 ± 7.44 $\mu\text{M/mg}$ tissue). Thus, PST-Aa suggests new promising sources in the treatment of neurodegenerative disorders.

Keywords: stereotaxic surgery; hybrid sulfated galactans; neuroprotection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Representação esquemática das vias dos núcleos da base	22
Figura 2-	Representação da síntese de dopamina e neurotransmissão dopaminérgica.	24
Figura 3-	Aspecto morfológico e classificação taxonômica de <i>A. armata</i>	32
Figura 4-	Estrutura química de galactanas sulfatadas	35
Figura 5-	Classificação das estruturas das unidades de dissacarídeos das carragenanas.....	36
Figura 6-	Esquema do procedimento de extração dos polissacarídeos sulfatados totais de <i>A.armata</i> (PST-Aa).....	44
Figura 7-	Ilustrações da infusão intracerebroventricular de 6-hidroxidopamina por estereotaxia.....	48
Figura 8-	Protocolo experimental do modelo de Doença de Parkinson em ratos	49
Figura 9-	Teste do campo aberto.....	51
Figura 10-	Teste do cilindro.....	52
Figura 11-	Teste rotacional induzido por Apomorfina.....	52
Figura 12-	Esqueletos básicos encontrados das Díades formadoras de galactanas do tipo d/l híbridas de PST-Aa.....	62
Figura 13-	Eletroforese em gel de agarose 0,5% dos polissacarídeos sulfatados de <i>Asparagopsis armata</i>	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Relação dos picos obtidos de polissacarídeo sulfatado no espectro de FT-IR com os grupos funcionais de <i>A. armata</i>	55
Gráfico 2 - Espectro de RMN de ¹ H do polissacarídeo extraído de <i>Asparagopsis armata</i>	58
Gráfico 3- Espectro de RMN de ¹³ C do polissacarídeo extraído de <i>Asparagopsis armata</i>	58
Gráfico 4- Espectro de RMN de ¹ H- ¹³ C HSQC do polissacarídeo extraído de PST-Aa.....	58
Gráfico 5- Perfil cromatográfico dos polissacarídeos sulfatados de <i>A. armata</i>	63
Gráfico 6- Atividade locomotora no teste do campo aberto.....	65
Gráfico 7- Atividade do Cilindro.....	66
Gráfico 8- Teste rotacional induzido por Apomorfina	68
Gráfico 9- Análises neuroquímicas de nitrito/nitrato das regiões encefálicas.....	70
Gráfico 10- Análises neuroquímicas de Peroxidação Lipídica das regiões encefálicas.....	72
Gráfico 11- Análises neuroquímicas de Glutathiona reduzida das regiões encefálicas.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Tratamento dos grupos experimentais.....	49
Tabela 2-	Rendimento e análises químicas de <i>Asparagopsis armata</i> (PST-Aa).....	55
Tabela 3-	Relação dos picos obtidos de polissacarídeo sulfatado no espectro de FT-IR com os grupos funcionais de <i>A. armata</i>	56
Tabela 4-	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC para as unidades estruturais de carragenana e agarana mais comuns encontradas para PST-Aa.	60
Tabela 5-	Deslocamento químicos RMN de ^1H - ^{13}C HSQC para PST-Aa	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6- hidroxidopamina
α -syn	Alfa sinucleína
AADC	Aminoácido aromático descarboxilase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPC	Cloreto de cetilperidino
COMT	Catecol O-Metiltransferase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DHA	Ácido docosahexanóico
DP	Doença de Parkinson
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GPC	Cromatografia de Permeação em gel
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GSH	Glutathiona reduzida
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOs	Óxido nítrico sintetase induzida
L-Dopa	L-3,4 diidroxifenilalanina
MAO	Monoamina oxidase
MANF	Fator neurotrófico derivado de astrócito mesencefálico
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
NGF	Fator de crescimento nervoso

NF-kB	Fator de transcrição nuclear Kappa B
O ₂	Superóxido
PUFAS	Ácidos graxos poliinsaturados
PN	Peróxidonitrito
PST	Polissacarídeo Sulfatado Total
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância nigra pars compacta
TH	Tirosina hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TrKB	Receptor cinase B de topomiosina
VMAT	Transportador vesicular de monoamidas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1	Doença de Parkinson.....	21
2.1.1	<i>Etiologia/Fisiopatologia.....</i>	<i>21</i>
2.1.1.1	<i>Síntese e Neurotransmissão dopaminérgica.....</i>	<i>23</i>
2.1.2	<i>Corpos de Levy.....</i>	<i>25</i>
2.1.3	<i>Neuroinflamação e Estresse oxidativo na Doença de Parkinson.....</i>	<i>26</i>
2.2	Tratamento da Doença de Parkinson.....	28
2.3	Algas marinhas.....	29
2.3.1	<i>Algas vermelhas (Rodophyta).....</i>	<i>30</i>
2.3.2	<i>Asparagopsis armata Harvey.....</i>	<i>31</i>
2.4	Polissacarídeos Sulfatados: Estrutura química e Aspectos gerais.....	33
2.4.1	<i>Estrutura das Galactanas Sulfatadas</i>	<i>34</i>
2.5	Modelos animais e uso de 6-Hidroxiopamina na DP.....	39
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	Geral.....	41
3.2	Específicos.....	41
4	MATERIAIS.....	42
4.1	Alga marinha.....	42
4.2	Drogas e Reagentes.....	42
5	MÉTODOS.....	43
5.1	Extração de polissacarídeos sulfatados totais.....	43
5.2	Caracterização química e estrutural.....	45
5.2.1	<i>Determinação do teor de carboidratos totais.....</i>	<i>45</i>
5.2.2	<i>Determinação de sulfato livre.....</i>	<i>45</i>
5.2.3	<i>Quantificação de contaminantes proteicos.....</i>	<i>45</i>
5.2.4	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	<i>45</i>
5.2.5	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	<i>46</i>
5.2.6	<i>Eletroforese em gel de agarose.....</i>	<i>46</i>

5.2.7	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	46
5.3	Indução do Modelo da Doença de Parkinson por meio da injeção unilateral 6-OHDA através de Cirurgia Estereotaxica em ratos	47
5.3.1	<i>Animais</i>	47
5.3.2	<i>Aspectos éticos</i>	47
5.3.3	<i>Cirurgia estereotaxica</i>	48
5.3.4	<i>Protocolo experimental</i>	48
5.3.5	<i>Tratamento dos grupos experimentais</i>	49
5.4	Avaliação dos testes comportamentais	50
5.4.1	<i>Teste do Campo aberto</i>	50
5.4.2	<i>Teste do Cilindro</i>	51
5.4.3	<i>Teste rotacional induzido por apomorfina</i>	52
5.5	Dissecação de áreas cerebrais para as dosagens neuroquímicas	53
5.5.1	<i>Determinação da Concentração de Nitrito (NO₂)/ Nitrato (NO₃)</i>	53
5.5.2	<i>Determinação da Concentração de Peroxidação Lipídica (TBARS)</i>	53
5.5.3	<i>Determinação da Concentração de Glutathiona reduzida (GSH)</i>	54
5.6	Análises Estatísticas	54
6	RESULTADOS	55
6.1	Rendimento e teores químicos dos Polissacarídeos Sulfatados de <i>Asparagopsis armata</i>	55
6.2	Caracterização estrutural dos polissacarídeos Sulfatados de <i>Asparagopsis armata</i>	55
6.2.1	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)</i>	55
6.2.2	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	57
6.3	Eletroforese em gel de agarose	62
6.4	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	63
6.5	Avaliação do efeito neuroprotetor dos PST-Aa no modelo da Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA	64
6.5.1	<i>Campo aberto</i>	64
6.5.2	<i>Cilindro</i>	66
6.5.3	<i>Teste da Apomorfina</i>	68
6.6	Dosagens neuroquímicas	68

6.6.1	<i>Determinação da Concentração de Nitrito (NO₂)/ Nitrato (NO₃) das regiões encefálicas.....</i>	69
6.6.2	<i>Determinação da Concentração de Peroxidação Lipídica (TBARS) das regiões encefálicas.....</i>	70
6.6.3	<i>Determinação da Concentração de Glutathiona reduzida (GSH) das regiões encefálicas.....</i>	72
7	DISCUSSÕES.....	75
8	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXO A- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFC-NPDM.....	98

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada como uma desordem neurológica crônica e progressiva que afeta os neurônios dopaminérgicos situados na região da substância *nigra pars compacta* (SNpc), resultando em alterações motoras devido à diminuição de dopamina no corpo estriado (HUANG; ZHANG; CUI, 2019). Os principais sintomas motores que podem ser observados nessa doença são o tremor de repouso, rigidez muscular, bradicinesia ou movimentos lentos voluntários, instabilidade postural e distúrbios na marcha (WANG et al., 2022).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, afetando cerca de cinco milhões de pessoas idosas em todo o mundo, com idades variando entre 60 e 90 anos. Ela é superada apenas pela doença de Alzheimer (CUNHA, SIQUEIRA, 2020). O impacto dessa doença tem gerado efeitos significativos nos setores sociais, econômicos e de saúde, além de causar grande sofrimento aos pacientes. No Brasil, aproximadamente 220 mil pessoas são afetadas por essa patologia. Estima-se que a cada ano sejam diagnosticados mais de 36 mil novos casos da doença, e de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de casos de pessoas com DP dobrará até 2030 (PINTO et al., 2022).

A etiologia da DP ainda é desconhecida, no entanto, diversos fatores como neuroinflamação, inclusões de corpos citoplasmáticos em células neuronais e aumento do estresse oxidativo, têm sido sugeridos como possíveis desencadeadores dessa doença (CAGGIU et al., 2019). Estudos realizados em diferentes pacientes têm demonstrado que sintomas não motores, como ansiedade, depressão, distúrbios do sono, demência, hiposmia e constipação, podem se manifestar até 20 anos antes do desenvolvimento dos sintomas motores da doença (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

O tratamento atualmente disponível no mercado baseia-se na reposição de dopamina no estriado, sendo a levodopa (L-DOPA) o principal medicamento utilizado (WANG et al., 2022). No entanto, o uso prolongado desse medicamento tem acarretado diversos efeitos adversos, tais como complicações motoras, toxicidade e perda de eficácia ao longo dos anos (PAYAMI, 2017).

Diante desse contexto, a busca por novas drogas terapêuticas potenciais a partir de fontes naturais tem aumentado significativamente nos últimos tempos. As algas marinhas têm

recebido muita atenção e importância devido à sua capacidade de fornecer uma ampla gama de aplicações biotecnológicas e farmacológicas, devido à sua riqueza na produção de compostos naturais. Dentre esses compostos, os polissacarídeos sulfatados (PS) têm se destacado. Os PS são macromoléculas polianiónicas que possui diversos efeitos biológicos registrados na literatura científica, tais como atividade anticoagulante (ADRIEN et al., 2019; RODRIGUES et al., 2010), atividades anti-inflamatórias (SANJEEWA et al., 2018; COURA et al., 2015) e ações antioxidantes (KHAN et al., 2020). Pesquisas têm comprovado a eficácia dos polissacarídeos sulfatados no combate ao estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção mitocondrial, fatores conhecidos por contribuir para a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (HANNAN et al., 2020). Estudos também demonstraram os efeitos neuroprotetores dos polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas, como a *Gelidium pristoides* (Turner), contra danos neuronais induzidos por zinco no hipocampo de ratos (células HT-22) (MARTINS et al., 2022).

A espécie de alga vermelha *Asparagopsis armata* Harvey possui diversos metabólitos secundários relatados na literatura com atividades antitumorais e antimicrobianas (HORTA et al., 2019). No entanto, efeitos sobre atividades neuroprotetoras de macromoléculas de polissacarídeos sulfatados usando modelos comportamentais *in vivo* ainda são escassas. Devido à diversidade funcional e integridade estrutural únicas desses compostos, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização química e estrutural dos polissacarídeos sulfatados totais extraídos da alga marinha *Asparagopsis armata* Harvey, além de avaliar sua atividade neuroprotetora em um modelo experimental *in vivo* da Doença de Parkinson.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Doença de Parkinson

2.1.1 Etiologia/Fisiopatologia

A Doença de Parkinson foi inicialmente descrita por James Parkinson em 1817 e é considerada a segunda doença neurodegenerativa em número de casos, afetando mais de 1% da população idosa acima dos 60 anos (SZASZ et al., 2021). Estima-se que mais de 6,1 milhões de pessoas sofram com esse distúrbio. As causas da Doença de Parkinson ainda são desconhecidas, porém fatores como susceptibilidade genética, exposições ambientais a toxinas e eventos celulares anormais podem contribuir para o surgimento das desordens neurodegenerativas (BARNHILL; MURATA; BRONSTEIN, 2020).

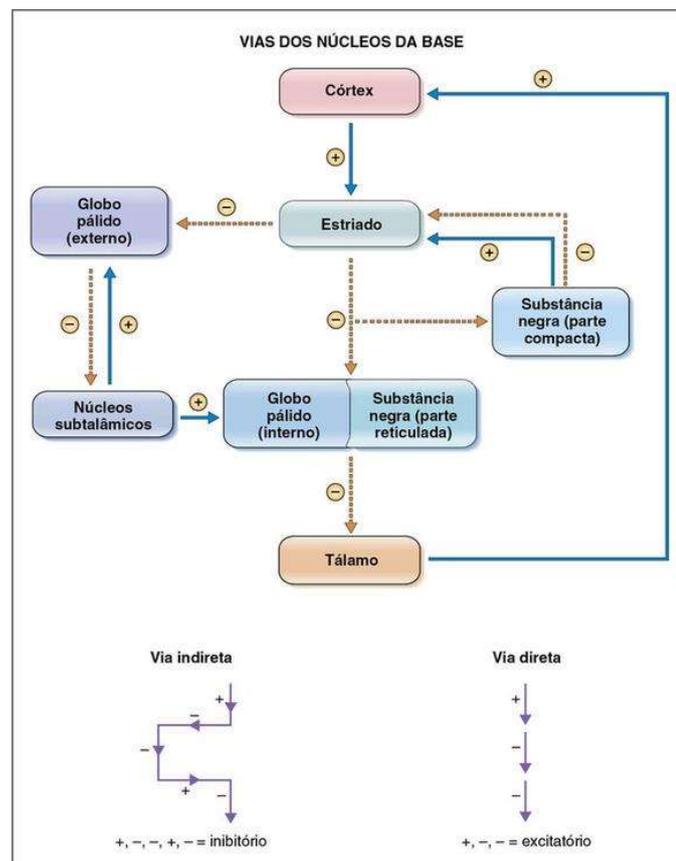
A principal característica apresentada em pacientes com DP é a degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos localizados na região do mesencéfalo, especificamente na substância *nigra pars compacta* (SNpc), o que leva à depleção de dopamina no estriado dorsal motor. Essas estruturas fazem parte do sistema basal ganglionar, um conjunto de gânglios responsáveis pelo controle e modulação dos movimentos (AARSLAND et al., 2017).

As estruturas que compõem os núcleos da base são o estriado, que é constituído pelo caudado e putâmen, e contém receptores dopaminérgicos excitatórios e inibitórios para o neurotransmissor dopamina. Além do estriado, também fazem parte dos núcleos da base o globo pálido segmento interno (GPi) e externo (GPe), o núcleo subtalâmico e a substância *nigra pars reticulada* e *compacta*. O córtex motor está constantemente recebendo e enviando informações dos núcleos da base por meio de fibras nervosas para os neurônios motores da medula espinal, a fim de regular as funções relacionadas aos movimentos voluntários e à postura (CARMO, 2015).

Os neurônios estriatais formam duas vias: a via direta e a via indireta. Na via direta, ocorre uma estimulação excitatória (mediada pelo neurotransmissor GABA) dos neurônios presentes no estriado, que inibem o segmento interno do globo pálido e a substância *nigra pars reticulada*. Isso resulta em excitação (mediada pelo neurotransmissor glutamatérgico) dos neurônios presentes no tálamo. Dessa forma, a informação chega ao córtex, emitindo um sinal de ativação para os neurônios motores da medula espinal, o que resulta em estimulação e

regulação dos movimentos voluntários. Por outro lado, na via indireta, ocorre a inibição do globo pálido segmento externo, o que leva a uma estimulação de ativação no núcleo subtalâmico. Essa excitação, por sua vez, inibe o globo pálido interno, que reprime a atividade talâmica. Essa excitação, por sua vez, inibe o globo pálido interno, que reprime a atividade talâmica, resultando no bloqueio da atividade motora (Figura 1) (GONÇALVES et al., 2021).

Figura 1- Representação esquemática das vias dos núcleos da base em funcionamento normal e na Doença de Parkinson.



Fonte: Costanzo, Linda S, (2018)

Legenda: Via dos núcleos da base representada por meio das relações do córtex cerebral com os núcleos da base e o tálamo. As linhas contínuas azuis representam as vias excitatórias, enquanto que as linhas pontilhadas amarelas são inibitórias. O resultado da via indireta é inibição ou bloqueio do movimento e a via direta é excitação ou ativação dos movimentos.

A Doença de Parkinson afeta principalmente a via nigroestriatal, que é composta pelos neurônios dopaminérgicos da substância nigra *pars compacta* (SNpc) que se projetam para o estriado, liberando dopamina e regulando os movimentos voluntários (CHUPROSKI, 2018). Quando a região da SNpc sofre depleção de seus neurônios dopaminérgicos, ocorre uma diminuição na liberação de dopamina para o estriado. Isso resulta na inibição da via direta e na

ativação da via indireta, levando à inativação dos movimentos voluntários por meio da inibição do córtex motor (GONÇALVES et al., 2021).

A ausência de dopamina no estriado desencadeia um conjunto de sintomas em indivíduos portadores desses distúrbios, tais como tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (SPRENGER; POEWE, 2013). Pesquisas têm comprovado que esses distúrbios têm uma natureza multissistêmica, apresentando características não motoras associadas a alterações psiquiátricas, como distúrbios do sono e vigília, depressão, ansiedade, disfunções intestinais (constipação), comprometimento cognitivo e demência. Esses sintomas podem surgir até 20 anos antes dos sintomas motores (GOLDMAN; POSTUMA, 2014). Esses dados revelam que a Doença de Parkinson envolve outros sistemas, como o serotoninérgico, noradrenérgico do tronco cerebral e colinérgico, tanto na região frontal quanto no tronco cerebral (WEINTRAUB et al., 2020).

2.1.1.1 Síntese e Neurotransmissão dopaminérgica

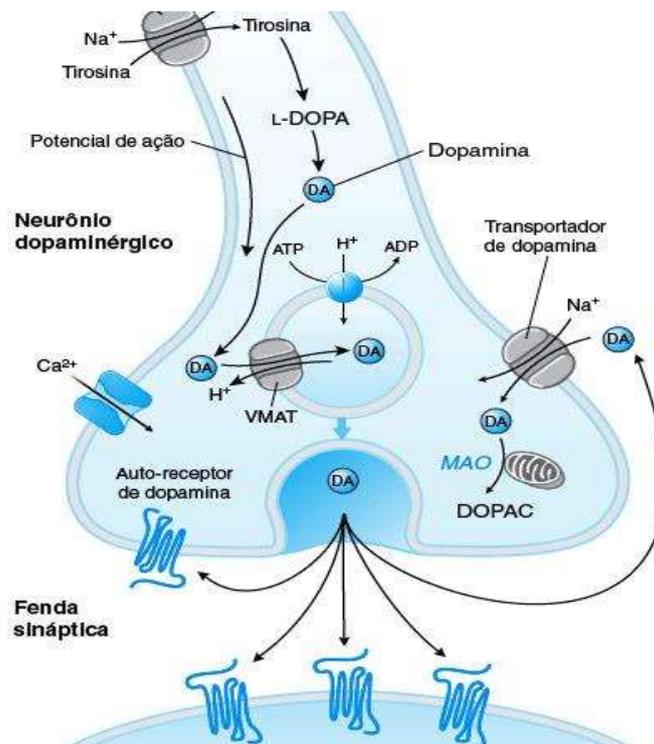
O neurotransmissor dopamina (DA) é uma monoamina pertencente à família das catecolaminas devido à presença de um núcleo catecol (di-hidróxi-ortobenzeno) em sua estrutura química, semelhante à adrenalina e noradrenalina (DI GIOVANNI et al., 2016). A dopamina desempenha diversas funções em regiões específicas do cérebro e do corpo, relacionadas à regulação motora, processos cognitivos, recompensa e aprendizado (PANDEY et al., 2013).

A síntese da dopamina ocorre a partir do aminoácido tirosina, que pode ser obtido através da dieta ou sintetizado no fígado a partir da fenilalanina (CHUPROSKI, 2018). Inicialmente, a tirosina é hidroxilada pela enzima tirosina hidroxilase (TH), formando o composto L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Em seguida, ocorre uma descarboxilação da L-DOPA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC), resultando na formação da dopamina (DAMASCENO, 2014).

Após a produção de dopamina no interior dos neurônios dopaminérgicos, ocorre o seu armazenamento em vesículas sinápticas através dos transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT) (Figura 2). A liberação de dopamina ocorre em resposta a potenciais de ação e à entrada de cálcio, o que desencadeia a exocitose e o movimento das vesículas em direção à fenda sináptica do neurônio pré-sináptico. Nessa região, a dopamina liberada se liga aos receptores dopaminérgicos presentes no neurônio pós-sináptico. Após exercer suas funções

nos receptores, a dopamina pode ser recaptada para o interior do neurônio pré-sináptico pelo transportador de dopamina (DAT) ou sofrer degradação pelas enzimas monoaminas oxidases (MAO-A e MAO-B) e catecol-O-metiltransferase (COMT) (EISENHOFER; REICHMANN, 2012).

Figura 2- Representação da síntese de dopamina e neurotransmissão dopaminérgica.



Fonte: Standaert; Galanter, 2014.

Legenda: A tirosina é transportada para o interior do neurônio por meio do transportador L-aminoácidos aromáticos que utiliza o gradiente de sódio (Na^+) da membrana neuronal. Ao ser transportada a tirosina é convertida em L-DOPA através da ação da enzima tirosina hidroxilase que por sua vez é convertida em dopamina (DA) pela descarboxilase L-aminoácido aromáticos. A dopamina é recaptada para o interior das vesículas sinápticas por meio do transportador de monoaminas vesicular (VMAT) com gasto de energia da molécula de ATP em ADP. O potencial de ação quando liberado promove movimentação das vesículas para fenda sináptica para que a dopamina exerça suas funções sobre os receptores dopaminérgico no neurônio pós-sináptico. Após realizarem suas funções a dopamina pode ser recaptada novamente para o interior do neurônio por meio do transportador de monoamina oxidase ou ser auto-recaptada.

Os receptores alvo da dopamina expressos nos neurônios do sistema nervoso central (SNC) pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G ou receptores metabotrópicos. Esses receptores possuem sete hélices transmembranares que atravessam a membrana plasmática do neurônio e se acoplam às proteínas G, o que resulta na modulação de cascatas de sinalização que ativam ou inibem um segundo mensageiro intracelular, como o AMPc (BHATIA; SAADABADI, 2019). Os receptores de dopamina são divididos em dois grandes

grupos: os receptores do tipo D1, que incluem os subtipos D1 a D5, e os receptores do tipo D2, que compreendem os subtipos D2, D3 e D4 (DAMASCENO, 2014).

Os receptores D1 são excitatórios, pois sua ativação leva à estimulação da adenilil ciclase, enquanto os receptores D2 são inibitórios, pois inibem a atividade da adenilil ciclase. Ambos os tipos de receptores dopaminérgicos estão presentes nos neurônios que compõem as vias direta e indireta no estriado. Além do cérebro, esses receptores também podem ser encontrados em outras estruturas extracerebrais, como o coração, as veias e a glândula suprarrenal (ARREOLA et al., 2016).

2.1.2 *Corpos de Levy*

Um dos principais indicadores da Doença de Parkinson que tem recebido muita atenção nos últimos anos é a presença de corpos de Lewy nas células neuronais. Esses corpos de Lewy são agregados proteicos compostos principalmente por proteínas como ubiquitina, sinfilina-1 e, especialmente, a alfa-sinucleína (α -syn) (DEXTER; JENNER, 2013).

A alfa-sinucleína é uma proteína abundante nos compartimentos pré-sinápticos e possui uma massa molecular de 14 kDa, sendo composta por 143 resíduos de aminoácidos e codificada pelo gene SNCA (TEIL et al., 2020). Embora a etiologia exata do surgimento desses agregados proteicos nas células neuronais ainda seja desconhecida, a disfunção mitocondrial tem sido identificada como um dos principais fatores neuropatogênicos associados (FENTON; JONGENS; HOLZBAUR, 2021).

A função da alfa-sinucleína ainda está sendo amplamente investigada, no entanto, estudos têm descrito seu papel nos terminais pré-sinápticos dos neurônios, desempenhando funções na plasticidade sináptica, transporte de vesículas e liberação de neurotransmissores (SU et al., 2021). A formação de agregados anormais de alfa-sinucleína pode levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio dentro dos neurônios, resultando em uma redução da adenosina trifosfato (ATP). A falta de energia em estruturas como o cérebro pode levar à ativação da autofagia, respostas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, à apoptose (FENTON; JONGENS; HOLZBAUR, 2021).

Com os avanços na genética molecular, a compreensão da fisiopatologia da Doença de Parkinson (DP) tem sido aprimorada. Estudos destacam que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância *nigra pars compacta* (SNpc) não explica completamente o

mecanismo patológico da DP. Em vez disso, a DP é considerada um distúrbio sistêmico no qual a proteína alfa-sinucleína desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão da doença (ROUAUD et al., 2021).

O mecanismo fisiopatológico da alfa-sinucleína está relacionado à sua função sináptica no controle da liberação de neurotransmissores por meio das vesículas sinápticas. Mutações em regiões genéticas importantes para as funções dessa proteína podem levar à formação de conformações oligoméricas solúveis que têm uma alta propensão para se agregar em estruturas de fibrilas no interior das células neuronais. Isso resulta em interrupção da homeostase, morte celular e neuroinflamação (RAY et al., 2021).

2.1.3 Neuroinflamação e Estresse oxidativo na Doença de Parkinson

Os fatores associados ao surgimento da degeneração de neurônios dopaminérgicos em pacientes com a doença de Parkinson ainda precisam de investigações adicionais. No entanto, muitas pesquisas têm demonstrado que a formação de aglomerados de alfa-sinucleína no interior dos neurônios está associada ao surgimento da neuroinflamação, o que leva ao aumento do estresse oxidativo neuronal e, conseqüentemente, à degeneração (HE et al., 2020).

A neuroinflamação é uma resposta protetora do organismo em face de agentes nocivos ao sistema nervoso central. Mecanismos neuroinflamatórios, como ativação da microglia, reação astrocítica e infiltração de linfócitos, produzem respostas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias que, em situações crônicas, podem ter efeitos prejudiciais para os neurônios (PICCA et al., 2021).

A micróglia é uma célula imune que faz parte do sistema glial e desempenha uma função importante na defesa do sistema nervoso central (SNC), atuando na fagocitose de agentes nocivos. Sua atividade inclui a liberação de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4 e IL-6, a fim de combater os agentes agressores e manter a homeostase neuronal. No entanto, quando essas respostas inflamatórias não são controladas, podem causar danos aos neurônios dopaminérgicos (BADANJAK et al., 2021).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) excede as defesas antioxidantes presentes nas células neuronais. Devido ao alto consumo de oxigênio pelos neurônios dopaminérgicos, são constantemente produzidas EROS, como o superóxido (O₂⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). No entanto, essas EROS são

decompostas rapidamente pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase em compostos não reativos (HE et al., 2020).

É importante destacar que em condições normais, os radicais livres podem desempenhar funções importantes no interior das células, como a regulação do crescimento celular e a sinalização intercelular. No entanto, em condições anormais, o aumento dessas moléculas pode causar danos às membranas plasmáticas, levando à peroxidação lipídica, e também pode comprometer o material genético, afetando funções de proteínas e enzimas. O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora importante, que desempenha um papel em diversos processos fisiológicos, como os sistemas respiratório, neuromuscular, imunológico e outros. Especificamente no sistema nervoso, o NO está envolvido na liberação de neurotransmissores, no aprendizado, na memória e na excitabilidade neuronal. No entanto, quando sua produção é excessiva, ele pode reagir com o superóxido (O_2^-) e formar o peroxinitrito (PN), um composto altamente reativo (TAYLOR; MAIN; CRACK, 2013). Isso pode promover neurotoxicidade nas células neuronais e ativar as células da glia, incluindo a micróglia, levando a um aumento na atividade reativa da micróglia e comprometendo a funcionalidade dos neurônios dopaminérgicos (NUNES; LARANJINHA, 2021).

O sistema antioxidante tem a capacidade de estabilizar moléculas reativas por meio de processos de oxidação-redução, prevenindo danos oxidativos no interior das células. Um dos principais compostos que desempenham um papel biomarcador na doença de Parkinson é o sistema de glutathione (GSH), que é formado por três aminoácidos: cisteína, ácido glutâmico e glicina. A cisteína contém um grupo tiol em sua cadeia lateral, que é responsável por fornecer a capacidade redutora do GSH, enquanto o ácido glutâmico possui um grupo carboxílico em sua cadeia lateral, conferindo a capacidade de tamponamento do GSH. Esse sistema de glutathione atua por meio das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase. A glutathione peroxidase utiliza o GSH para neutralizar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, resultando na oxidação da glutathione (GSSG). Em seguida, a glutathione reductase regenera a glutathione reduzida, utilizando uma molécula de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Dessa forma, a glutathione é restaurada e pode continuar exercendo sua função antioxidante sobre outros radicais livres presentes no interior da célula neuronal (BJØRKLUND et al., 2021).

Dessa forma, na doença de Parkinson, ocorre a geração de inúmeros radicais livres, muitos dos quais são produzidos pela micróglia e devido à alta demanda de oxigênio pelos neurônios dopaminérgicos. Além disso, a auto-oxidação da dopamina leva à formação de

catecolaminas quinonas (DAQ), que são compostos altamente reativos no interior neuronal. Nesse contexto, a quantificação da glutathione fornece informações importantes sobre o sistema redox e a sobrevivência das células (HE et al., 2020).

2.2 Tratamento da Doença de Parkinson

A terapia disponível no mercado atualmente para a Doença de Parkinson (DP) baseia-se principalmente na reposição de dopamina no estriado dorsal motor, visando aliviar os sintomas motores. O principal medicamento utilizado na prática clínica é a Levodopa, que pertence ao grupo dos antiparkinsonianos (DONZUSO et al., 2021).

O tratamento com Levodopa é realizado por via oral, sendo prontamente absorvida no intestino por meio de transportadores ativos de aminoácidos neutros. Geralmente, esse medicamento é administrado em combinação com um inibidor da descarboxilase da dopa, sendo o mais conhecido a carbidopa. A carbidopa reduz a degradação da Levodopa no intestino e aumenta sua biodisponibilidade na corrente sanguínea, diminuindo os efeitos colaterais. No cérebro, a Levodopa consegue atravessar a barreira hematoencefálica por meio de transportadores de aminoácidos neutros, resultando em sua descarboxilação pela enzima L-aminoácido descarboxilase aromática e na formação de dopamina na substância nigra pars compacta (SNpc). Esse neurotransmissor atua no estriado, repondo os níveis de dopamina e melhorando os sintomas motores em pacientes com Parkinson (BOELEN KEUN et al., 2021).

A Levodopa, quando utilizada no início dos sintomas motores, apresenta efeitos eficazes. No entanto, à medida que a doença progride, seu efeito pode se tornar ineficiente, resultando em complicações motoras, como flutuações motoras, psicose, discinesia e distúrbios neurológicos caracterizados por movimentos involuntários coriáticos e distônicos das extremidades (PANDEY; SRIVANITCHAPOOM, 2017). O uso prolongado da Levodopa pode levar à tolerância nos pacientes, o que requer o aumento da dose para obter uma resposta satisfatória ao tratamento (BECKERS; BLOEM; VERBEEK, 2022). Além da Levodopa, outros medicamentos, como agonistas da dopamina (DA) e agentes não-dopaminérgicos, são amplamente utilizados em pacientes com DP. No entanto, ainda não são conhecidas terapias que previnam ou interrompam a progressão da doença (ELLIS; FELL, 2017).

Diante desse contexto, é necessário investigar novas fontes terapêuticas naturais capazes de gerar efeitos significativos com menos reações adversas. Os organismos marinhos, como as macroalgas, têm se destacado devido à sua riqueza em metabólitos primários e

secundários, que possuem benefícios para a saúde humana e propriedades biológicas (GANESAN; TIWARI; RAJAURIA, 2019).

2.3 Algas marinhas e sua importância

As algas marinhas são organismos autotróficos e fotossintetizantes que possuem a clorofila a como seu principal pigmento. Elas pertencem ao reino Protista e podem ser unicelulares ou multicelulares (filamentosas). Apresentam uma estrutura morfológica composta por filamentos celulares chamados de talos, que não possuem caules, raízes e folhas verdadeiras (GUIRY, 2012). As algas marinhas são um dos maiores produtores de biomassa no ambiente marinho e possuem uma ampla diversidade de compostos (SALEHI et al., 2019).

A parede celular das algas é formada por celulose, uma estrutura rígida que desempenha função de resistência e proteção. Elas também possuem uma matriz mucilaginosa, composta por uma rede intrincada de diferentes macromoléculas, que preenche o volume extracelular de um tecido ou órgão. Essa matriz é composta por uma variedade de proteínas multivalentes e polissacarídeos sulfatados associados, os quais são responsáveis pela flexibilidade estrutural celular e equilíbrio iônico (BAGHIEL; REDDY; SINGH, 2021).

O habitat das algas marinhas é predominantemente marinho, mas também podem ser encontradas em ambientes úmidos como águas estuarinas, dulcícolas (de água doce), rios, lagos, manguezais e até mesmo em fontes de águas termais. As algas marinhas podem ter formas de vida livre e flutuante, associadas a organismos fitoplâncton que habitam a coluna d'água, ou podem ser bentônicas, fixadas ao substrato marinho e crescendo em rochas, esqueletos de corais mortos ou qualquer outra superfície. Em termos de extensão estrutural, as algas marinhas podem ser classificadas como macroalgas (de maior porte) ou microalgas (de menor porte) (PAL; KAMTHANIA; KUMAR, 2014).

A classificação das algas marinhas é dividida em grupos eucarióticos, incluindo as Chlorophyta (algas verdes), Ochrophyta (algas marrons ou pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas), bem como o grupo procariótico Cyanophyceae, que abrange as algas verde-azuladas. Esses grupos são classificados com base em características ultraestruturais e bioquímicas, ciclo reprodutivo, composição de pigmentos e tipo de polissacarídeo de reserva (SALEHI et al., 2019).

As algas marinhas têm sido reconhecidas por seus diversos benefícios para a saúde humana e também para diversos setores industriais. Na alimentação, por exemplo, as algas são

consumidas há milênios em várias culturas devido à sua riqueza em compostos de baixa caloria, proteínas, minerais, carboidratos, vitaminas e fibras alimentares. Estudos têm mostrado que o consumo de algas marinhas na dieta está associado a um menor risco de desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes, câncer, doenças cardiovasculares, obesidade, síndrome metabólica e doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (FLEURENCE; LEVINE, 2016; PEREIRA; VALADO, 2021).

As algas marinhas são fontes ricas de produtos químicos bioativos, como lectinas, peptídeos, terpenoides, polifenóis, vitaminas, minerais e polissacarídeos, que possuem efeitos biológicos, como atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas. Um exemplo é a carragenana, um polissacarídeo extraído de algas vermelhas, que tem sido estudado para descoberta de novos medicamentos e terapias modificadas para o tratamento de doenças graves. Esses polímeros têm sido testados em estudos para o combate a infecções virais, como HPV e HSV, entre outros (PRADHAN; KI, 2023). Com base nos estudos sobre algas marinhas e sua relação com a saúde humana, pesquisas têm investigado e comprovado o efeito de moléculas bioativas com atividades neuroprotetoras (SOUZA et al., 2018).

2.3.1 Algas vermelhas (Rhodophyta)

As algas vermelhas são organismos pluricelulares que apresentam uma distribuição mundial, podendo ser encontradas em habitats diversos, incluindo água doce, salobra e principalmente em ambientes marinhos temperados e tropicais. Este filo abrange aproximadamente 7.000 espécies catalogadas (GUIRY, 2012).

Uma característica marcante das algas vermelhas é a capacidade de absorver luz azul devido à presença de um pigmento acessório chamado ficoeritrina, uma proteína pertencente à família das ficobiliproteínas, que confere a coloração avermelhada a essas espécies. Essa capacidade de absorção de luz azul permite que as algas vermelhas sobrevivam em águas profundas (PEREIRA et al., 2020).

O filo Rhodophyta possui grande importância nos setores econômicos, industriais e farmacológicos devido à extração de ágar, utilizado na indústria alimentícia há mais de 350 anos. O ágar é usado na produção de espessantes, geleias e gomas (LIAO et al., 2021). Outro composto explorado pela indústria é a carragenana, um polímero hidrocoloide utilizado como agente estabilizante na produção de gelatinas, além de seu uso nos setores cosmético, farmacêutico e biotecnológico (GÜRKAN POLAT; DUMAN; TUNÇ, 2020).

Na farmacologia, as carragenanas e agaranas têm sido relatadas na literatura como possuindo diversas atividades, tais como antiviral, antibacteriana, anticoagulante, antioxidante e propriedades imunomoduladoras. Essas propriedades estão relacionadas à natureza de suas estruturas e ligações químicas. Além disso, sua baixa toxicidade e a capacidade de apresentarem qualidades multifuncionais, como biodisponibilidade e biodegradabilidade, contribuem para seus efeitos biológicos (METTWALLY et al., 2022).

2.3.1.1 *Asparagopsis armata* Harvey

A alga *Asparagopsis armata* Harvey é uma espécie de alga vermelha (Rhodophyta) pertencente à família Bonnemaisoniaceae (JACINTO, 2015). Originária da Austrália, no sul do hemisfério, atualmente essa alga está distribuída por todo o mundo, incluindo as costas ocidentais da Inglaterra, costa atlântica da Espanha, Ilhas Canárias, França, Portugal e outros mares do Pacífico (GARON-LARDIERE, 2004; KRAAN, BARRINGTON, 2005).

A morfologia da *A. armata* Harvey é caracterizada pela presença de ramos laterais semelhantes a arpões no talo gametófito, como mostrado na Figura 3 (ZANOLLA et al., 2014). O talo é formado por ramos grossos que estão emparelhados e organizados em espiral, com múltiplas ramificações laterais em diferentes direções, dando uma aparência plumosa. A característica distintiva da espécie é observada nos ramos finais, que afinam e lembram a forma de arpões (ANDREAKIS et al., 2004). Quanto à coloração, varia de rosa claro a vermelho e roxo brilhante (PACIOS et al., 2011).

Figura 3- Aspecto morfológico e Classificação taxonômica de *A. armata* Harvey



Filo: Rhodophyta
Classe: Florideophyceae
Subclasse: Rhodymeniophycidae
Ordem: Bonnemaisoniales
Família: Bonnemaisoniaceae
Gênero: *Asparagopsis*
Espécie: *Asparagopsis armata*

Fonte: Roque et al., (2019) Legenda: Imagem de *A. armata* em seu habitat natural oceânico.

Devido à sua alta taxa de crescimento e capacidade de disseminação em ambientes naturais, *A. armata* Harvey é considerada uma espécie invasora, capaz de se proliferar rapidamente em um curto espaço de tempo (SILVA et al., 2021). Apresenta uma estrutura reprodutiva do tipo trifásico, composta por um gametófito, carposporófito e tetrasporófito (CHUALÁIN et al., 2004; PACIOS et al., 2011), o que possibilita uma reprodução prolífica com a produção de novos propágulos por meio de rizoides e estolões (ALTAMIRANO et al., 2008).

As aplicações biotecnológicas de *A. armata* Harvey estão presentes em diversos setores industriais. Pesquisas têm comprovado que o uso de *A. armata* como alimento para o gado resulta em uma redução de mais de 50% na emissão entérica de metano, contribuindo para a diminuição das emissões de gases de efeito estufa (ROQUE et al., 2019). Além disso, estudos demonstraram que a espécie *A. armata* Harvey pode ser utilizada na remoção de metais pesados altamente tóxicos presentes em corpos d'água, como Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ni^{2+} (SRIVASTAVA; AGRAWAL; MONDAL, 2015).

Os metabólitos secundários produzidos por *A. armata* têm uma ampla gama de aplicações terapêuticas, como os compostos halogenados de baixo peso molecular, que apresentam atividades antibacteriana, antifúngica e antibiótica (ANDREAKIS; PROCACCINI; KOOISTRA, 2004; GENOVESE et al., 2009). O estudo de Horta et al. (2019) demonstrou que a associação de *A. armata* com bactérias epífitas foi capaz de produzir compostos bioativos que apresentaram potenciais efeitos antitumorais e antimicrobianos. Em atividades citotóxicas,

extratos metanólicos e diclorometano de *A. armata* mostraram um efeito potente na redução da viabilidade *in vitro* de células do câncer colorretal humano, apresentando-se como uma alternativa terapêutica no tratamento do câncer e com efeito antiproliferativo (ALVES et al., 2018). Além disso, atividades antioxidantes e anti-inflamatórias foram relatadas para compostos bioativos de *A. armata* (FÉLIX et al., 2021).

Os estudos com polissacarídeos sulfatados ainda são escassos, porém Haslin et al. (2001) demonstraram que polissacarídeos sulfatados presentes na parede celular de células reprodutivas gaméticas de *A. armata* tiveram inibição da replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em um modelo *in vitro*. No entanto, são necessárias mais investigações dessas macromoléculas devido à sua importância e aos seus efeitos em atividades biológicas.

2.4 Polissacarídeos Sulfatados: Estrutura química e Aspectos gerais

Os polissacarídeos sulfatados são macromoléculas complexas, polianiónicas, constituídas por unidades de glicídios unidas por ligações glicosídicas e apresentam grupos sulfatos, que conferem uma carga negativa (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967). Dependendo da unidade de repetição desses polímeros, eles podem ser classificados como homopolissacarídeos, quando são formados pela mesma unidade monossacarídica, ou heteropolissacarídeos, quando há diferenças entre os açúcares formados. Além disso, eles podem apresentar diferenças na constituição de suas cadeias, podendo ser lineares ou ramificadas (HENTATI et al., 2020). Esses polissacarídeos sulfatados são abundantes em algas marinhas e em alguns invertebrados do reino animal (JIAO et al., 2011).

Na parede celular das algas, especificamente na matriz mucilaginosa, os polissacarídeos sulfatados desempenham um papel importante na proteção contra a desidratação, regulação mecânica, osmótica e iônica (MICHEL et al., 2010). Uma das funções essenciais dos polissacarídeos sulfatados é a capacidade de reter umidade, o que aumenta a resistência das algas à dessecação durante períodos de baixa maré. Essas macromoléculas também podem estar envolvidas na interação e adesão celular, formando uma barreira protetora contra patógenos (VAVILALA, SOUZA, 2015).

Dependendo da classificação das algas, os polissacarídeos sulfatados podem apresentar diferenças na estrutura química da parede celular. Nas algas vermelhas, esses polímeros ocorrem principalmente na forma de galactanas sulfatadas (PEREIRA et al., 2005; SILVA et al., 2010), nas algas pardas são encontradas fucanas sulfatadas e alginatos (MOURÃO, 2004; AZEVEDO et al., 2009), e nas algas verdes há uma prevalência de polissacarídeos do tipo ulvanos (CIANCIA; FERNÁNDEZ; LELIAERT, 2020).

Os efeitos biológicos dos polissacarídeos sulfatados estão relacionados a diversos fatores estruturais, como a composição monossacarídica, padrão de ligação glicosídica, massa molecular, grau de sulfatação e posição dos grupos sulfato. Esses fatores podem influenciar na estrutura-atividade e afetar as respostas biológicas (RAY et al., 2021).

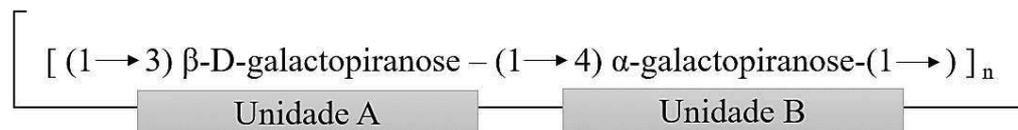
Na literatura, existem inúmeros relatos sobre os efeitos dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, incluindo propriedades anticoagulantes, antitrombóticas, antioxidantes, antinociceptivas, anti-inflamatórias, antibacterianas, antidiabéticas, antidiarreicas, antitumorais, antivirais e imunomoduladoras (AROKIARAJAN et al., 2022). Alguns estudos destacam atividades antioxidantes (KHAN et al., 2020), anticoagulantes (RODRIGUES et al., 2010), anti-inflamatórias (COURA et al., 2012), anticancerígenas (LI et al., 2021), imunomodulatórias (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011) e neuroprotetoras (SOUZA et al., 2017).

2.4.1. Estrutura das Galactanas Sulfatadas

As galactanas sulfatadas são polissacarídeos constituídos de unidades monoméricas do tipo D-galactose e são encontrados de forma abundante nas algas vermelhas (Rhodophyta). Essas galactanas são formadas pela repetição alternada $(AB)_n$ do dissacarídeo constituído pelos resíduos β (1 \rightarrow 3) D-galactopiranosose e α (1 \rightarrow 4) galactopiranosose os quais recebem denominação de unidades A e B respectivamente. Na estrutura dos monômeros de galactose da unidade A pode ser observado a presença de grupos químicos nos carbonos C-6 tais como, O-metil e grupos éster sulfato ligados no C-2, C-4, C-6. Na unidade B do resíduo de galactose, pode ser observado a presença do grupo químico éter metílico no C-3, uma ligação anidro-açúcar no C-2, bem como ramificações nas unidades de resíduos de galactose (SOKOLOVA et al., 2021).

Existe dois grandes grupos de galactanas sulfatadas identificadas com base na estrutura da configuração estereoquímica que são denominadas de agaranas e carragenanas. A diferença entre agaranas e carragenanas está nas suas configurações estereoquímicas. Nas carragenanas, a unidade A da galactose apresenta a configuração D e a unidade B da galactose também encontra-se na configuração D. Enquanto os dissacarídeos repetitivos das agaranas apresentam a unidade A da galactose com configuração D e unidade B da galactose com configuração L (RAY et al., 2021).

Figura 4- Estrutura química de Galactanas sulfatadas



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: As galactanas sulfatadas são formadas pela repetição alternadas dos dissacarídeos demonstrado na unidade A e B.

As carragenanas apresentam padrões de classificação que se baseia na quantidade e posição dos grupos sulfatos e a presença da ligação 3,6 anidrogactose na unidade B da D-Galactose. Portanto, as carragenanas estão distribuídos em 4 tipos principais que são identificadas por prefixos gregos: kappa (κ), lambda (λ), Ômega (ω) e Beta (β) representadas na figura 4 (VASCONCELOS et al., 2015).

As carragenanas do tipo Kappa (κ) apresenta sulfatação no C-4 da unidade A (1 \rightarrow 3- β -D-galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -D-galp(1 \rightarrow), e a unidade B pode apresentar variações na posição dos grupos sulfatos recebendo classificações diferentes como as carragenanas iota (ι) apresentando a 3,6 anidrogactose-2-sulfato. As carragenanas Mu (μ) e Nu (ν) apresentam sulfatação no C-6 e 2,6-dissulfatado e as carragenanas Omicron (\omicron) com sulfatação no C-2 (NECAS et al., 2013).

As carragenanas do tipo Lambda (λ) possui a sulfatação no C-2 de ambas (A e B) os resíduos de galactose e na unidade B ainda possui sulfatação no C-6. As lambdas carragenanas podem ainda receber classificação de Xi (ξ) apenas quando os dois resíduos A e B estão sulfatados no C-2 e as carragenans Pi (π) e Theta (θ) que apresentam na unidade B o 4,6-O-(1-carboxi-etilideno-2-sulfato) e o 3,6-anidrogactose-2-sulfato respectivamente. Importante ressaltar que a carragenana theta não é biossintetizada de forma natural nas algas, tornando-se necessário a utilização de tratamento alcalino da λ -carragenana (NECAS et al., 2013)

A família Beta (β) são carragenanas que não possuem sulfatação no resíduo de galactose da unidade A, apenas apresentam o resíduo de 3,6-anidrogactose na unidade B. A unidade B classifica os tipos de carragenanas beta, as α -carragenanas possuem o 3,6-anidrogactose-2-sulfato, já a carragenana gamma (γ) possuem um grupo sulfato no C-6, ainda faz parte dessa classificação a delta (δ) com sulfatação em 2,6-dissulfato. As carragenanas Omega (ω) possuem na unidade A grupos sulfatos no C-6 e 3,6-anidrogactose na unidade B. A classificação psi (ψ) apresenta na unidade B apenas o grupo sulfato no C-6 assim como na unidade A. Os principais tipos de carragenanas comerciais são as kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ), é importante ressaltar que as carragenanas Mu e Nu são precursores das carragenanas kappa e iota (VASCONCELOS et al., 2015).

Figura 5- Classificação das estruturas das unidades de dissacarídeos das carragenanas

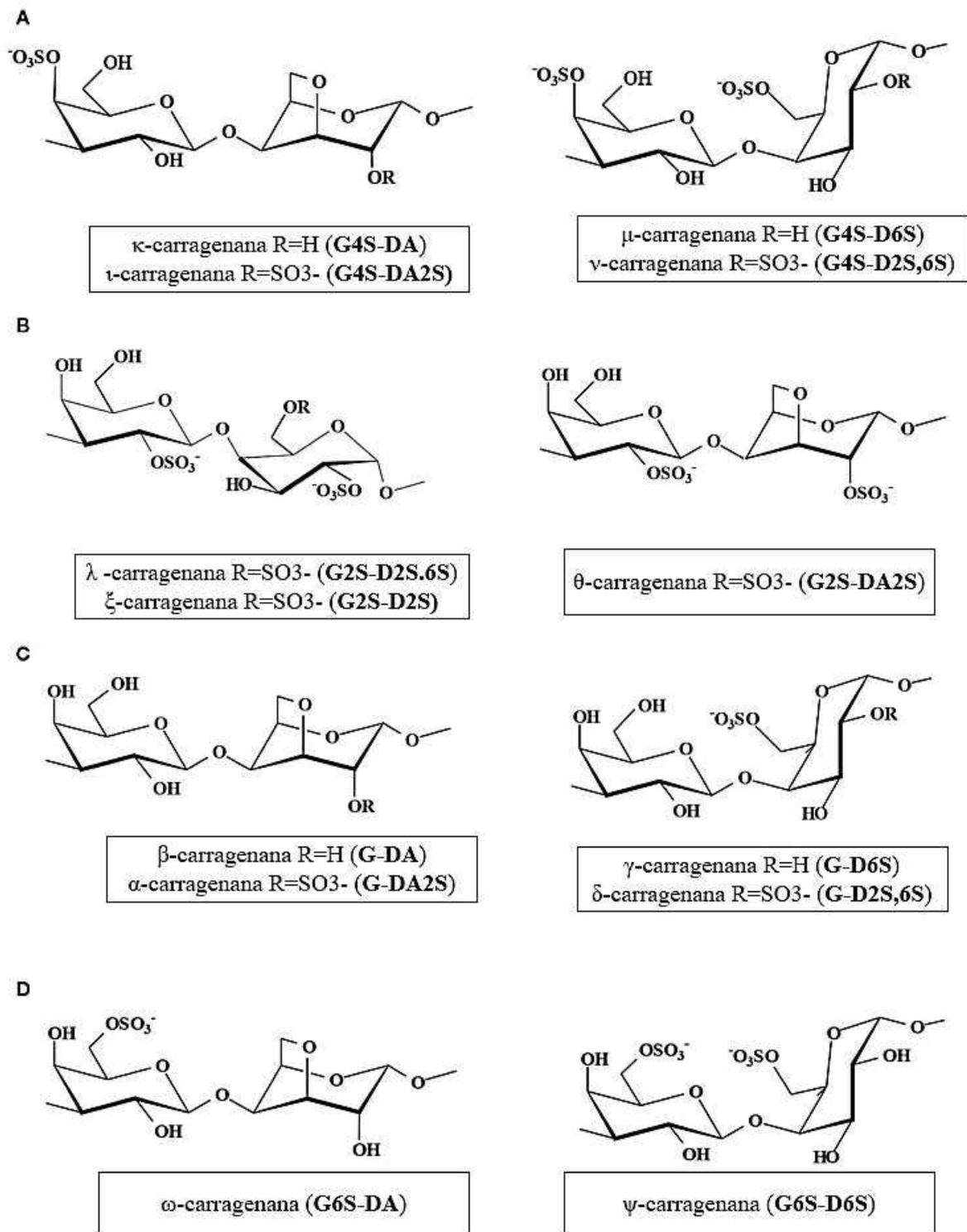


Figura traduzida de Ciancia; Fernández; Leliaert, (2020).

Legenda: Estruturas das díades das diferentes famílias das carragenanas. A- Família Kappa (κ), B- Família Lambda (λ), C- Família Beta (β) e D- Família Omega (ω).

As agaranas também conhecida como ágar apresenta uma estrutura linear possuindo na unidade B o resíduo de α -L-galactopiranosose que pode sofrer reação de ciclização no carbono 3 e 6 do anel piranosose formando a unidade B do dissacarídeo na forma de 3,6-anidro- α -L-galactose. Frequentemente os grupamentos de hidroxilas podem apresentar substituições por outros compostos como ésteres de sulfatos, ácido pirúvico, 3,6 anidrogalactose e grupo metil (CIANCIA; FERNÁNDEZ; LELIAERT, 2020).

As estruturas químicas das agaranas apresentam dois tipos de polímeros diferentes a agarose que constitui um polissacarídeo neutro formado pela repetição do dissacarídeo (1-3)- β -D-galactose e (1-4)-3,6-anidro- α -L-galactose bastante utilizado nas áreas farmacêutica e biotecnológicas, possuindo aplicações como géis de separação em análises de cromatografia de permeação em gel e técnicas de eletroforese. O segundo polissacarídeo que constitui a estrutura das agaranas é a agarpectina um composto que formado que é constituída por grupos aniônicos como sulfato, glucuronato e grupo metil. No geral, as agaranas possuem quantidades de grupo sulfato menor do que as carragenanas, porém apresentam diferentes aplicações industriais devido suas propriedades gelificantes (VASCONCELOS et al., 2015). As agaranas por apresentarem alta capacidade de gelificação, por isso são chamados de hidrocolóides de suma importância nos mais variados setores industrial e alimentício com propriedade espessante e emulsificantes (USOV, 2011).

Além desses dois grupos de galactanas denominados de agaranas e carragenanas, existe um outro grupo de galactanas denominados de galactanas híbridas que são polissacarídeos complexos que possuem a unidade B do dissacarídeo tanto na configuração D como na configuração L. Alguns estudos relatam que desconhecem se esses resíduos de dissacarídeos repetitivos presentes tanto nas carragenanas como nas agaranas pertencem a uma mesma molécula de polissacarídeo sulfatado ou a moléculas separadas formando agregados difíceis de romper. Outros estudos da década de 90 relatam que diferentes espécies de algas carragenófitas e agarófitas produzem quantidades significativas de galactanas contendo unidades diastereoisométricas repetitivas, indicando um maquinário enzimático de biossíntese para ambos os tipos de galactanas (TAKANO et al., 2003). No entanto, são necessários mais estudos através de técnicas de caracterização a fim de elucidar completamente as estruturas dos híbridos d/l de galactanas sulfatadas.

2.5 Modelos animais e uso de 6-hidroxidopamina na DP

Os modelos experimentais com animais são considerados ferramentas bastante significativas, pois contribuem no entendimento dos aspectos fisiopatológicos de diversas patologias. Os modelos comumente usados na DP são sintomáticos, e apresentam vantagens por conseguir reproduzir com exatidão os circuitos cerebrais complexos os quais são necessários para compreensão das disfunções neurodegenerativas (KO; BEZARD, 2017).

O uso de neurotoxinas é amplamente utilizado em modelos de DP afim de desencadear um quadro motor da patologia em roedores ou primatas. A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é uma das mais conhecidas e usadas, sendo sua administração intracerebral. A 6-OHDA apresenta uma estrutura química semelhante a dopamina com exceção de uma hidroxila adicional em sua cadeia, a qual pode reagir com outras moléculas celulares presente no interior dos neurônios (REQUEJO et al., 2020).

Assim como a dopamina a 6-OHDA não consegue atravessar a barreira hematoencefálica necessitando que sua administração seja intracerebral por meio de cirurgia estereotaxia. A infusão da 6-OHDA pode ser administrada uni ou bilateralmente em diferentes regiões do encéfalo cada uma com respostas moleculares e celulares diferente. Quando sua infusão é feita unilateralmente na SNpc ocorre rápida degeneração dos neurônios dopaminérgicos enquanto que no estriado essa degeneração é lenta e retrógrada (CHUPROSKI, 2018).

O mecanismo de ação da 6-OHDA segue uma sequência de eventos celulares que causam danos na célula neuronal devido sua auto-oxidação produzindo formação de espécies reativas como o peróxido de hidrogênio que reagem com proteínas e lipídeos, podem atuar inibindo o complexo I e IV da cadeia transportadora de elétrons e diminuindo as defesas antioxidantes como a glutatona, superóxido dismutase e catalase. Esse aumento dos radicais livres resulta em apoptose ou morte neuronal (GOMES, 2021).

A validação desse modelo experimental pode ser analisada utilizando agonistas dopaminérgicos como a apomorfina que atua diretamente nos receptores dopaminérgicos presente no estriado, porém com a degeneração ocasionada pela 6-OHDA o animal apresenta um movimento rotatório, ou seja, contrário a lesão. Os sintomas motores e não motores são nitidamente observados, no entanto os aspectos celulares como os aglomerados de alfa-

sinucleína no interior das células neuronais não são observados nesse modelo (PARRA-PAZ et al., 2021).

Diante do exposto, foi testada a hipótese de que os polissacarídeos sulfatados de *A. armata* apresentam efeitos neuroprotetores em um modelo de doença de Parkinson em ratos induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Considerando que os polissacarídeos sulfatados possuem atividades biológicas diversas, como propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, são necessárias investigações adicionais que comprovem o efeito neuroprotetor *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar a estrutura química e investigar os efeitos neuroprotetores dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Asparagopsis armata* frente à degeneração estriatal, alterações comportamentais e neuroquímicas em modelo da doença de Parkinson induzida pela neurotoxina 6-hidroxidopamina em ratos.

3.2 Específicos

- Extrair e analisar os teores químicos (carboidratos totais, teores de sulfato livre e contaminantes proteicos) dos PST-Aa;
- Caracterizar a estrutura química dos PST-Aa pelas técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR); Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Caracterizar os PST-Aa quanto aos padrões de densidade e cargas negativas através da eletroforese em gel de agarose;
- Determinar a massa molar dos PST-Aa por Cromatografia de permeação em gel (GPC);
- Avaliar o efeito neuroprotetor *in vivo* dos PST-Aa através dos testes comportamentais (campo aberto, cilindro e apomorfina) no modelo de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA);
- Determinar os efeitos de PST-Aa em alterações neuroquímicas (níveis de nitrito/nitrato, peroxidação lipídica e glutatona reduzida);

4. MATERIAIS

4.1 Alga marinha

Amostras da alga marinha vermelha *A. armata* foram coletadas em Berlenga Nature Reserve (39°24'47.9"N 9°30'28.2"W) de Portugal com autorização prévia do Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). As algas foram conduzidas ao laboratório do Instituto Politécnico de Leiria em Peniche-Portugal onde foram lavadas com água destilada para retirada de areia, epífitas e/ou organismos incrustantes, e posteriormente liofilizadas e trituradas. Logo após, as algas foram enviadas (correios) ao Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), para realização do processo de extração.

4.2 Drogas e Reagentes

Sodium acetate (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); cysteine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Cetylpyridinium chloride (CCP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Agarose (Bioagency, São Paulo, SP, Brasil) Absolute ethanol (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); NaCl (Sodium Chloride) (Neon, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); papain (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); Sulfuric acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Hydrochloric acid (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Potassium bromide (KBr) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); sodium 2,2 dimethylsilapentane-5-sulfonate (DSS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Galactose (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); Sodium sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Apomorphine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Ketamine (Syntec, São Paulo, Brasil); Xylazine (Syntec, São Paulo, Brasil); Trichloroacetic acid; Phosphoric acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Monobasic phosphate (Dinâmica, São Paulo SP, Brasil); Dibasic phosphate (Dinâmica, São Paulo, SP, Brasil); reduced glutathione (GSH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); methanol; sodium nitrite (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); N-(1-naphthyl) ethylenediamine; Sulfonylamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); Ellman's reagent; Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA);

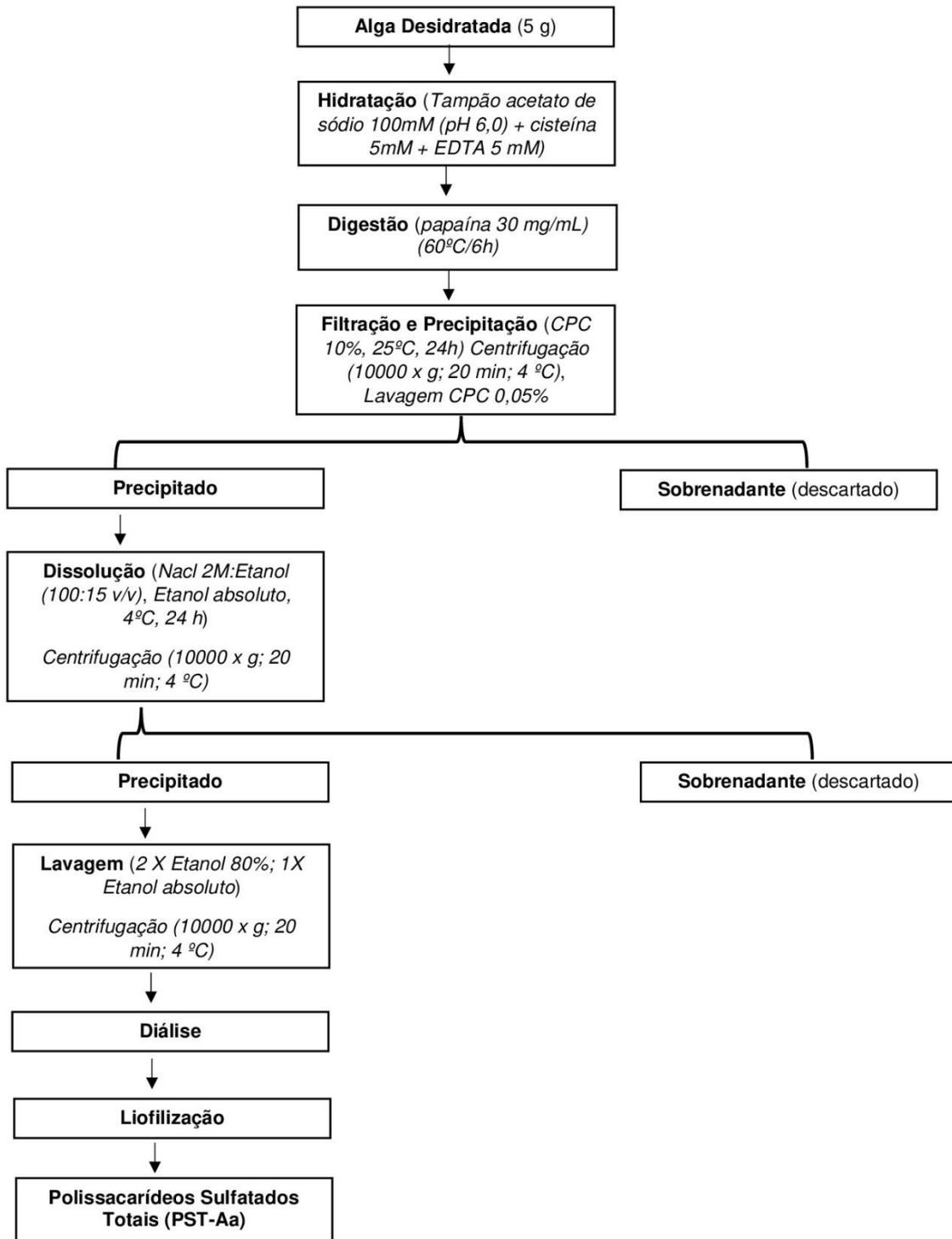
5 MÉTODOS

5.1 Extração de polissacarídeos sulfatados totais

A extração dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) foi realizada seguindo protocolo descrito por Farias e colaboradores (2000), com adaptações. Inicialmente, 5 g da alga seca foi hidratada em 250 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 5 mM e cisteína 5 mM (pH 6,0) (proporção de 1:50, m/v), acrescido de 20 mL de papaína (30 mg/kg). A solução foi incubada em banho-maria a 60 °C durante 6h e após esse período, o material foi filtrado em tecido de nylon. Para a precipitação dos polissacarídeos sulfatados, foram adicionados ao sobrenadante 25 mL de cloreto de cetilpiridínio (CCP) a 10%, por 24 h. Após a precipitação, o extrato foi centrifugado (10000 x g, 20 min, 4 °C), o precipitado lavado com 200 mL de CCP 0,05% e novamente centrifugado (10000 x g, 20 min, 4 °C). Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em 160 mL de NaCl 2 M: etanol (100:15; v:v) e novamente precipitado através da adição de 300 mL de etanol absoluto gelado (24 h; 4 °C). Após esse período, o material foi centrifugado (10000 x g, 20 min, 4 °C), e o precipitado foi lavado duas vezes com 300 mL de etanol 80% e uma terceira vez com 300 mL de etanol absoluto. Após as lavagens, os polissacarídeos foram dialisados contra água destilada (poro da membrana de 76 mm) e liofilizados, para obtenção dos polissacarídeos sulfatados totais de *Asparagopsis armata* PST-Aa (Figura 6). O Rendimento dos polissacarídeos sulfatados foram obtidos pelo seguinte cálculo:

$$\text{Rendimento do PST-Aa \%} = \frac{\text{Massa (g) do PST obtido após a liofilização}}{\text{Massa (g) da alga seca utilizada na extração}}$$

Figura 6- Procedimento de extração dos Polissacarídeos Sulfatados Totais de *A. armata* (PST-Aa)



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: O esquema representa o procedimento de extração dos PST-Aa. A alga seca (5g) é hidratada com tampão de acetato de sódio (100 mM, pH 6,0), e a papaína, uma enzima proteolítica, é utilizada para hidrolisar proteínas presentes na parede celular da alga marinha, afim de isolar os Polissacarídeos sulfatados.

5.2 Caracterização química e estrutural

5.2.1 Determinação do teor de carboidratos totais

Para a análise do percentual de carboidratos totais dos PST-Aa, foi utilizado o método do ácido sulfúrico/UV (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013). Foi preparada uma solução estoque de 1 mg/mL de polissacarídeos sulfatados a qual foi diluída em três proporções diferentes 1:10, 1:20 e 1:30. Após isso, foi adicionado 1 mL das diferentes diluições preparadas à 3 mL de ácido sulfúrico e agitadas por 30 segundos. Em seguida, a solução foi colocada em banho de gelo por 2 min até estabelecer a temperatura ambiente de 25°C. Por fim, foi realizada leitura da absorbância a 315 nm em espectrofotômetro ultravioleta (UV). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A quantificação dos polissacarídeos foi realizada a partir de uma curva de calibração de concentrações crescentes de D-galactose (10 a 100 µg de galactose/mL).

5.2.2 Quantificação de sulfato livre

O teor de sulfato foi determinado por hidrólise ácida (4 mg/mL de HCl 1 M, 5 h, 105 °C) por turbidimetria a 360 nm pelo método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1961). O sulfato de sódio foi empregado como padrão.

5.2.3 Determinação de contaminantes proteicos

A determinação de contaminantes proteicos foi realizada seguindo o método de Bradford (1976). Foi preparada uma solução estoque de 1mg/mL de PST-Aa, e 1mL dessa solução foi adicionada a 2,5 mL do reagente de Bradford, após 10 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteínas foi estimada em relação a curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

5.2.4 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os dados de FT-IR foram obtidos em espectrômetro (IRTracer-100 Shimadzu, Japan). Foi utilizado 2 mg de amostras de PST-Aa as quais foram dispersas em 200 mg de brometo de potássio (KBr) e prensado a 80 kN (kiloNewton) para formar pastilhas de KBr com uma resolução de 4 cm⁻¹ e 64 scans por minuto na faixa de 400-4000 cm⁻¹.

5.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ^1H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”. As amostras foram preparadas dissolvendo-se 5 mg de PST-Aa em 600 μL de água deuterada com 1% de 2,2,3,3-d $_4$ -(3-trimetilsilil)-propionato de sódio (PST) para calibração espectral. O espectro unidimensional de ^1H foram obtidos a 60°C, com um tempo de espera entre cada aquisição de 2 s, aquisição de 32 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32k de número de pontos. Para auxiliar na atribuição dos sinais, foi realizado experimento bidimensionai heteronucleares de ^1H - ^{13}C HSQC com 112, com um tempo de espera em cada aquisição de 1 s, janela em na dimensão do ^{13}C (F1) de 200 ppm e na dimensão do ^1H (F2) de 16 ppm, com números de pontos em F1 de 200 e F2 de 1974.

5.2.6 Eletroforese em gel de agarose

Os PST-Aa foram avaliados quanto as características químicas de suas cargas negativas e padrões de densidade usando o sistema de eletroforese em gel de agarose 0,5% dissolvidos em tampão 1, 3 acetato diaminopropano 50mM (Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (pH 9,0). A amostra (20 μg) foi aplicada no gel e a corrida realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após o procedimento, os PST-Aa presentes no gel foram fixados com uma solução de N-cetil-N, N, N-brometo de trimetilamônio a 0,1% por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1%, após com o Stains-all e finalmente, descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; $\text{v}^{-1} \text{v}^{-1}\text{v}^{-1}$), como descrito por Dietrich e Dietrich (1976). Os padrões utilizados no procedimento foram glicosaminoglicanos obtidos de animais (condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparina (HEP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

5.2.7 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molar de pico (M_{pk}) foi determinada por meio de um cromatográfico SHIMADZU LC-10AD, um detector de índice de refração (RID-6A) e ultravioleta (UV- VIS SPA-10AV) a 254 nm. A coluna utilizada foi PolySep linear de dimensão 7,8 mm x 300 mm. Para fase móvel foi utilizado o nitrato de sódio (NaNO_3 /0,1 mol/L) em um fluxo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em temperatura ambiente de 25°. O volume de injeção da amostra (TPS-Aa) e dos padrões foi de 50 μL para cada análise. As amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg/ml e

filtradas membrana MILLIPORE 0,45 μm . As massas molares foram estimadas pela curva padrão de calibração de pululanas (Shodex P-82) com massa molar de $5,9 \times 10^3$ a $7,88 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

5.3 Modelo de Doença de Parkinson por meio da injeção unilateral 6-OHDA em ratos

5.3.1 Animais

Para este estudo foram utilizados ratos albinos da espécie *Rattus albinus novergicus* da raça Wistar, adultos, do sexo masculino com idade entre 8-9 semanas, com peso entre 250-270g (n=14 *per* grupo). Todos os animais foram provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos NPDM-UFC, local onde foi realizado todos os testes experimentais. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e mantidos em caixas grandes padrão de polipropileno recebendo água e alimentação *ad libitum*, com uma temperatura constante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) com ciclos de claro/escuro de 12 horas.

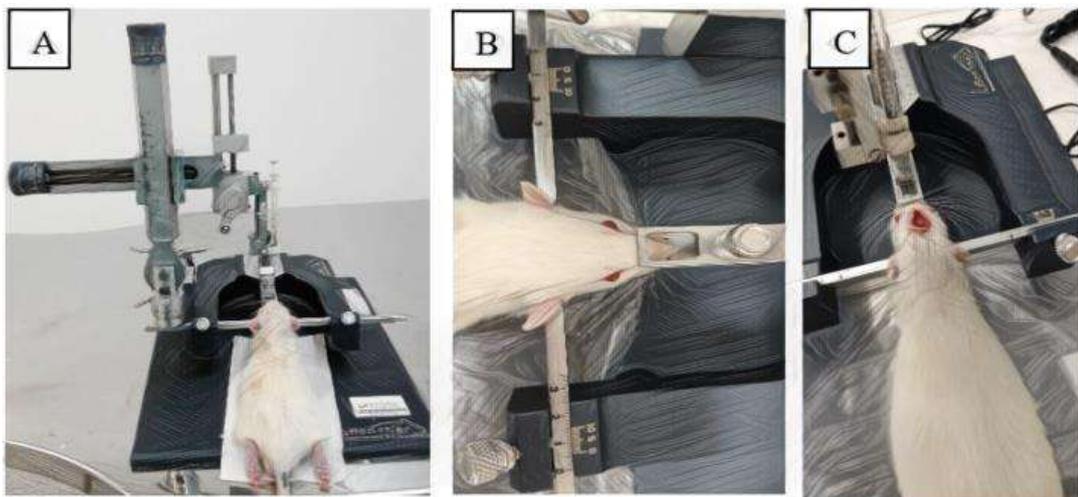
5.3.2 Aspectos éticos

O protocolo experimental deste projeto foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM-UFC). Todos os procedimentos experimentais foram elaborados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), a fim de minimizar o número e os sofrimentos dos animais. A aprovação desse projeto foi realizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do NPDM sob o protocolo (CEUA nº 20041021-0/2021). Anexo A

5.3.3 *Cirurgia estereotaxica*

Todos os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/Kg; i.p.) e xilasina (10 mg/Kg; i.p.), e após foi verificado se os animais apresentavam qualquer reflexo doloroso. Em seguida, a cabeça do animal foi fixada no aparelho estereotáxico (BONTHER), através de duas barras de fixação inseridas nos meatos auditivos externos do animal e os dentes incisivos fixados em uma barra de sustentação, logo após, foi feita uma tricotomia e assepsia da região superior da cabeça (álcool iodado) com remoção do periósteo para exposição da região do bregma. Após, foram determinadas as coordenadas estereotáxicas (em milímetros), segundo o atlas de Paxinos e Watson (1986), para a realização de 3 orifícios: 1: ML: -2.5, AP: +0.5, DV: +5.0; 2: ML: -3.0, AP: -0.5, DV: +6.0; e 3: ML: -3.7, AP: -0.9, DV: +6.5, em relação ao bregma (PAXINOS E WATSON, 1986), e feita a trepanação com auxílio de uma broca elétrica. Em seguida com uma seringa de Hamilton de 5 μ L, os animais receberam a injeção intracerebroventricular de 6-OHDA (6 μ L/ 21 μ g) e/ou solução salina (0.9%) no corpo estriado direito.

Figura 7- Ilustrações da infusão intracerebroventricular de 6-OHDA por estereotaxia



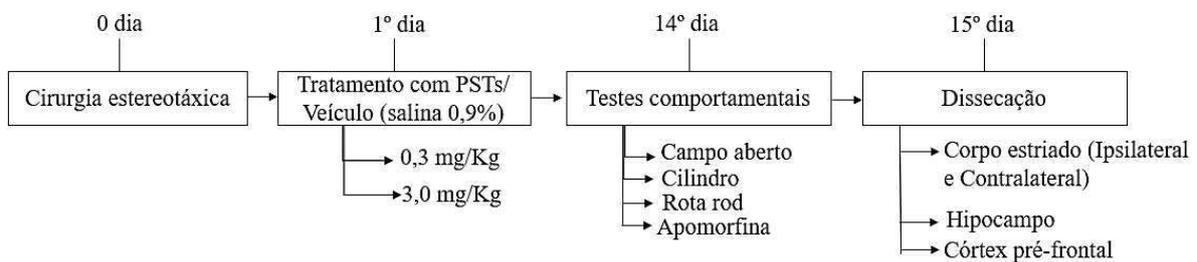
Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: Ilustrações da aplicação de 6-OHDA por estereotaxia. (A) Aparelho Estereotáxico BONTHER; (B) Fixação do animal; (C) Administração da 6-OHDA.

5.3.4 *Protocolo experimental*

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=14): O grupo I (sham) ou falso operado recebeu a injeção unilateral de solução salina 0,9% (lado ipsilateral), o grupo II recebeu a (6-OHDA, 6 μ L/ 21 μ g) e os grupos III e IV receberam a 6-OHDA e foram tratados com os PST na concentração de 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg respectivamente (Tabela 1).

Os animais foram tratados com polissacarídeos sulfatados e/ou veículo (solução salina (0,9%) por gavagem, uma vez ao dia no período diurno durante 14 dias consecutivos, após o último dia tratamento, 1h depois os animais foram submetidos aos testes comportamentais. No 15º dia, os animais foram eutanasiados por decapitação através do uso de guilhotina, e as regiões do corpo estriado (ipsilateral e contralateral), o hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados para análises neuroquímicas.

Figura 8- Protocolo experimental do experimento *in vivo*



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Esquema da realização dos testes comportamentais após a execução da cirurgia por estereotaxia.

5.3.5 Tratamento dos grupos experimentais

Após 24 horas da cirurgia, foi dado início ao tratamento dos animais com polissacarídeos sulfatados e/ou veículo (solução salina (0,9%) por gavagem, com utilização de uma agulha específica para ratos, a qual era introduzida pela boca do animal até a região gástrica, uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos. As doses de PST-Aa selecionadas foram determinadas com base em trabalhos anteriores com algas vermelhas, os quais demonstraram efeitos biológicos sob neuroproteção *in vivo*. Para o tratamento foram administradas doses de 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg. No 14º dia, após o último tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

Tabela 1- Tratamento dos grupos experimentais

Grupos experimentais	Injeção intracerebroventricular (6 μ L)	Tratamento (mg/Kg)	Via de administração
1	Salina (0,9 %)	Veículo	Administração oral
2	6-OHDA (21 μ g)	Veículo	Administração oral

3	6-OHDA (21 µg)	PST – Aa 0,3	Administração oral
4	6-OHDA (21 µg)	PST – Aa 3,0	Administração oral

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Tratamento após a cirurgia por estereotaxia durante 14 dias. Foram utilizados 4 grupos (n= 14 *per* grupo).

5.4 Avaliação dos testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados no período diurno, em salas de comportamentos desprovidas de barulhos externos. Todos os animais foram submetidos as mesmas condições experimentais, entre um animal e outro foram realizados a higienização com álcool 10% para descartar possíveis influências de resíduos deixados pelo animal. O teste do campo aberto e cilindro foram realizados com a utilização de luz vermelha de baixa intensidade (15 W), enquanto que os testes de rota rod e apomorfinina foram realizados sob iluminação normal.

5.4.1 Teste do Campo aberto

Para realização desse teste comportamental foi utilizada a metodologia de Sielgel (1946) e validada por Archer (1973), que avalia a atividade exploratória e locomotora do animal. Os animais foram colocados no centro da arena feita de acrílico e piso preto (50 cm × 50 cm × 50 cm) um por um inicialmente por um minuto para habituação, em seguida foram avaliados durante 5 min os seguintes parâmetros: número de cruzamento com as quatro patas (movimentação espontânea), número de levantamento sob as patas traseiras (*rearing*) e número de comportamento de auto-limpeza (*grooming*), adicionalmente o tempo em que os animais permanecerão parados.

Figura 9- Campo aberto



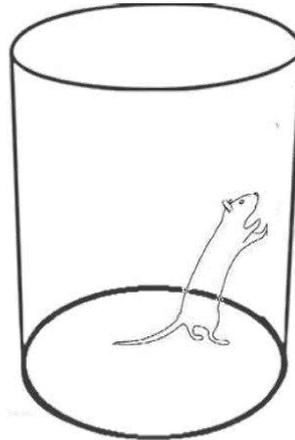
Fonte: Elaborado pelo autor, 2022. Legenda: Os animais foram avaliados no campo aberto por 5 min para avaliação da atividade exploratória dos animais.

5.4.2 Teste do Cilindro

O teste do cilindro avalia a lateralização espontânea das patas dianteiras. Os animais foram colocados individualmente dentro do cilindro de acrílico (30 x 20 cm) e observados por 5 min (SCHALLERT, 2000). Nenhuma adaptação dos ratos ao cilindro foi permitida antes do teste. Foram contados o número de toques na parede (contatos com dígitos totalmente estendidos), executados independentemente com o membro anterior ipsilateral e contralateral e ambas as patas simultaneamente. Os dados foram expressos como uma porcentagem de toques contralaterais, calculados como:

- ❖ Percentual Ipsilateral $[(\text{ipsilateral} / \text{Total}) \times 100]$
- ❖ Percentual Contralateral $[(\text{contralateral} / \text{Total}) \times 100]$
- ❖ Percentual de Ambas $[(\text{ambas} / \text{Total}) \times 100]$

Figura 10- Teste do Cilindro

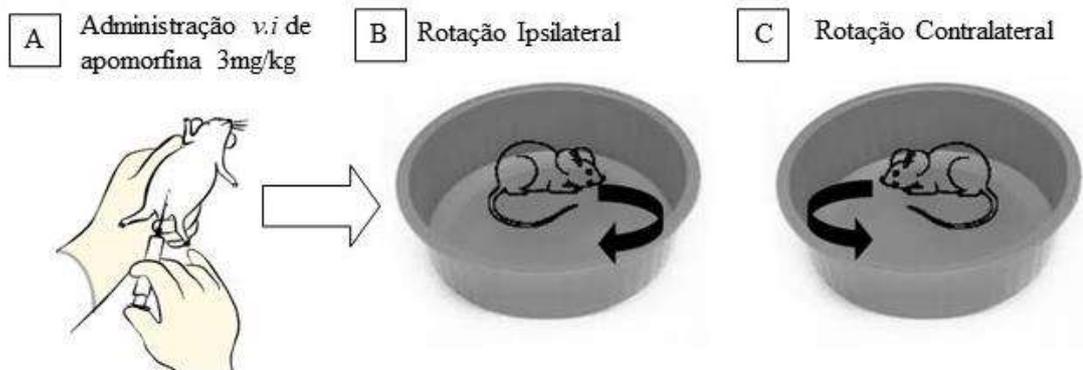


Fonte: Frota, 2020

5.4.3 Teste rotacional induzido por apomorfina

Esse teste utiliza o agente agonista dopaminérgico a apomorfina, essa por sua vez, quando administrada intraperitonealmente em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA promove movimentos de rotações contralaterais nos animais, validando o modelo de doença de Parkinson. O comportamento rotacional dos animais foi monitorado através das rotações induzidas por apomorfina (3 mg/kg, i.p), a qual induz um comportamento rotacional na direção contrária a lesão (lado contralateral) o número de rotações completas em volta do próprio eixo foi mensurado a cada 10 minutos, durante um período total de 60 minutos (KIM et al., 1998).

Figura 11- Teste rotacional induzido por Apomorfina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022. Legenda: Após administração do agonista apomorfina 3mg/kg. Os animais foram monitorados durante 60 min quanto ao número de rotações ipsilaterais e contralaterais. (A) Administração intraperitoneal de apomorfina 3mg/kg, (B) Rotação Ipsilateral, (C) Rotação Contralateral.

5.5 Dissecção de áreas cerebrais para as dosagens neuroquímicas

No 15º dia após os testes neurocomportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação através do uso de guilhotina, sendo retirados e separados rapidamente os encéfalos. Com o auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica de microdissecção foram removidos dos encéfalos os corpos estriados (ipsilateral e contralateral), o hipocampo e o córtex pré-frontal. Essas estruturas foram isoladas e resfriadas com gelo, logo em seguida foi feita a mensuração do peso úmido e posteriormente armazenadas em temperatura de -80 °C.

5.5.1 Determinação da Concentração de Nitrito (NO₂) /Nitrato (NO₃)

Para a determinação da concentração de nitrito/nitrato foram preparados homogenatos das amostras cerebrais a 10% (w/v) em solução de fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4. Os homogenatos foram centrifugados (11000 x g/ 15 min/ 4 °C), os sobrenadantes coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi incubada com 100 µL do reagente de Griess [ácido fosfórico 5%; sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%; N-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1% (NEED); água destilada (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi medida em leitor de Elisa a 540 nm. A concentração de nitrito (µM) foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram expressos em µM/mg de tecido (GREEN et al., 1982).

5.5.2 Determinação dos níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação foi medido através do ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme foi descrito por Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos dos tecidos a 10% em tampão fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4. Um volume de 250 µL do homogenato foi mantido em banho-maria a 37 °C por 1 h e posteriormente, foram precipitados com 400 µL de ácido perclórico 35%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (14000 x g/ 15 min/ 4 °C) e ao sobrenadante foi adicionado 200 µL de solução de ácido tiobarbitúrico

1,2%. As amostras foram incubadas em banho-maria (95-100 °C/ 30 min) e o conteúdo de TBARS determinado em leitor de Elisa a 532 nm.

5.5.3 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH)

Para a determinação da concentração de GSH, foi preparado um homogenato dos tecidos a 10% em EDTA 0,02 M. Em seguida, foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético 50%. O material foi agitado e centrifugado (3000 x g/ 15 min/ 4 °C). Posteriormente, foi recolhido 400 µL do sobrenadante e a ele foi adicionado 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 8,9) e 20 µL de DTNB 0,01 M (Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico ou reagente de Ellman). Após 1 min da reação, foi feita a leitura da coloração em leitor de Elisa a 412 nm. A concentração da glutathiona reduzida foi expressa em ng de GSH/g de tecido, conforme descrito por Sedlak e Lindsay (1988).

5.6 Análises Estatísticas

Todos os valores numéricos foram apresentados como erro padrão da média (EPM) e submetidos a análises de diferenças estatísticas através da análise de variância (*One-way* ou *Two-way* ANOVA), seguido pelo teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni, para dados paramétricos e, no caso de dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Comparação Múltiplas de Dunn. Consideraram-se os valores com $P < 0,05$ como estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 8.0, (San Diego, CA, EUA). Adicionalmente, todos os experimentos foram realizados por observadores “cegos”.

6 RESULTADOS

6.1 Rendimento e teores químicos dos polissacarídeos sulfatados de *Asparagopsis armata* Harvey

O rendimento do polissacarídeo sulfatado *Asparagopsis armata* Harvey (PST-Aa) extraído a partir de 5 g da alga seca resultou em 682,1 mg que corresponde a 13,64% conforme apresentado na tabela 2. A dosagem química de carboidratos totais solúveis foi de 53,20%. O teor de sulfato encontrado corresponde a 30,29%, enquanto que os contaminantes proteicos não apresentaram valores nas análises espectrofotométricas.

Tabela 2- Rendimento e análises químicas de *Asparagopsis armata* Harvey (PST-Aa)

Espécie	Rendimentos (%)	Carboidratos totais ^a (%)	Sulfatos livres ^b (%)	Contaminantes proteicos ^c (%)
<i>Asparagopsis armata</i>	13,64%	53,20	30,29	-

Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda a: Método do ácido sulfúrico/UV (Albalasmeh; Berhe; Ghezzehei, 2013)

b: Método da gelatina-bário de Dodgson; Price, (1961)

c: método de Bradford (1976)

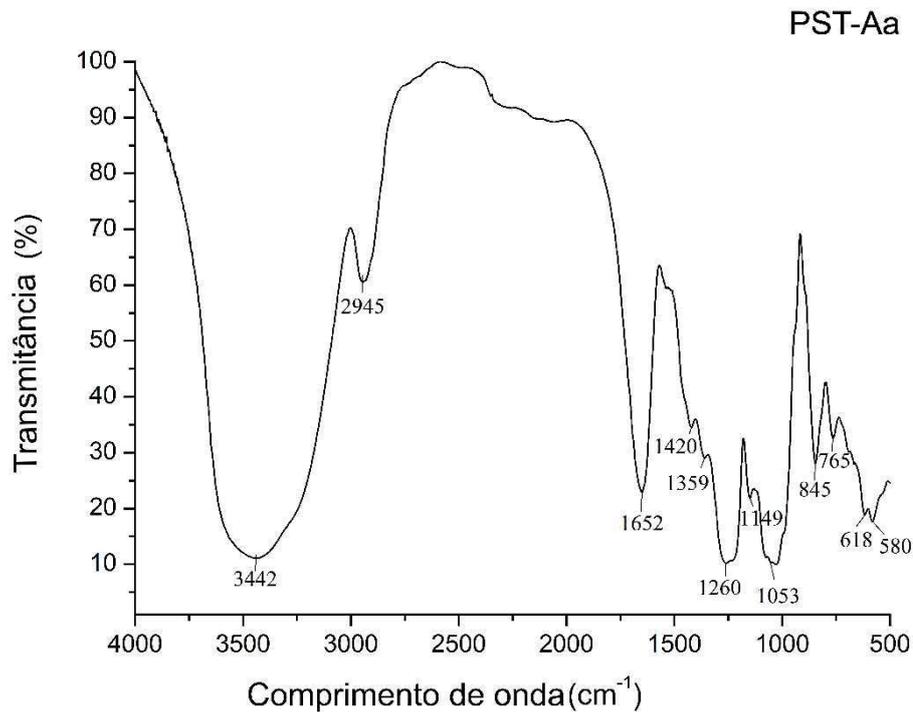
- : valores não detectados

6.2 Caracterização estrutural dos Polissacarídeos Sulfatados de *A. armata* Harvey

6.2.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os principais picos relacionados aos grupos funcionais das amostras de PST-Aa estão apresentados na figura 12. O espectro apresentou picos que variaram desde as regiões de 3442 cm^{-1} a 580 cm^{-1} . A presença de grupos sulfatados foi encontrada nas regiões 1260 cm^{-1} a 580 cm^{-1} . As regiões 845 cm^{-1} , 765 cm^{-1} sugerem que o polissacarídeo de *A. armata* tem estrutura semelhante a polímeros de carragenanas e agaranas (galactanas d/l híbridas).

Figura 12- Espectros de infravermelho dos Polissacarídeos Sulfatos de *A. armata* Harvey



Fonte: Elaborado pelo autor. Picos obtidos da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier relacionados aos principais grupos funcionais do Polissacarídeos sulfatados de *Asparagopsis armata*.

Tabela 3- Relação dos picos obtidos de polissacarídeo sulfatado no espectro de FT-IR com os grupos funcionais de *A. armata* Harvey

Comprimento de ondas cm⁻¹	Grupos funcionais	Referências
3442	Vibrações de alongamento O-H	SHANURA FERNANDO et al., 2017)
2945	C-H alifáticos	(SELMI et al., 2021)
1652	COOH ácido glicurônico	(FIDELIS, 2014)
1420	CH ₂ dobrando	(SUMAYYA; MURUGAN, 2017)
1359	CH	(SUMAYYA, MURUGAN, 2017)
1260	Deformação axial de S=O de ésteres de sulfatos	(SOUZA, 2012)

1149	Éster de sulfato	(CHOPIN et al., 1999)
1053	Esqueleto de galactanas (C - O + C - OH)	(CHAVES, 2008)
845	D-galactose-4-sulfato	(SOUZA et al., 2015)
765	C2-OS (3,6- anidrogactose)	(MARCIA et al., 2014)
580	O=S=O	(CHAVES, 2008)

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Grupos funcionais obtidos dos picos de espectroscopia de infravermelho dos polissacarídeos sulfatados de *Asparagopsis armata*.

6.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear do próton e carbono unidimensional (1D) RMN ^1H e ^{13}C e bidimensional de HSQC (2D) dos PST-Aa estão representados na figura 13, 14 e 15. É possível observar com base nos dados relatados na literatura que os PST-Aa apresentam sinais atribuídos a região anomérica e grupos substituintes formados por díades de Galactopiranosose (Galp) para carregenanas e agaranas (Tabela 4 e 5). Sinais sobrepostos entre δ 3,00 a δ 5,00 ppm no RMN ^1H possivelmente são atribuídos a H2, H3, H4, H5 e H6 das díades da galactana d/l híbrida de PST-Aa, sua estrutura pode ser observada na figura 17. O sinal no RMN ^1H em δ 2,06 é atribuído a cadeia polimérica acetilada e o sinal característico de H1/C1 (δ 4,51/106.44 ppm) de configuração β -glicosídica (Tabela 2) (LAJILI et al, 2019; ALRAZEM et al, 2007). Em δ 175,08 ppm é observado um sinal da carboxila (-COOH), sugerindo a presença de ácido urônico na cadeia polimérica (GOA et al 2020). Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C e HSQC mostram também o sinal em δ 3.49/59,51 ppm, δ 1,50 (1,51) /28,01 ppm que são atribuídos a CH_3 ligado ao grupo O-acetil e ao grupo O-piruvato, respectivamente (STEPHANIE et al, 2010; LAJILI et al, 2019).

Figura 3- Espectro de RMN de ^1H do polissacarídeo extraído de *Asparagopsis armata* Harvey

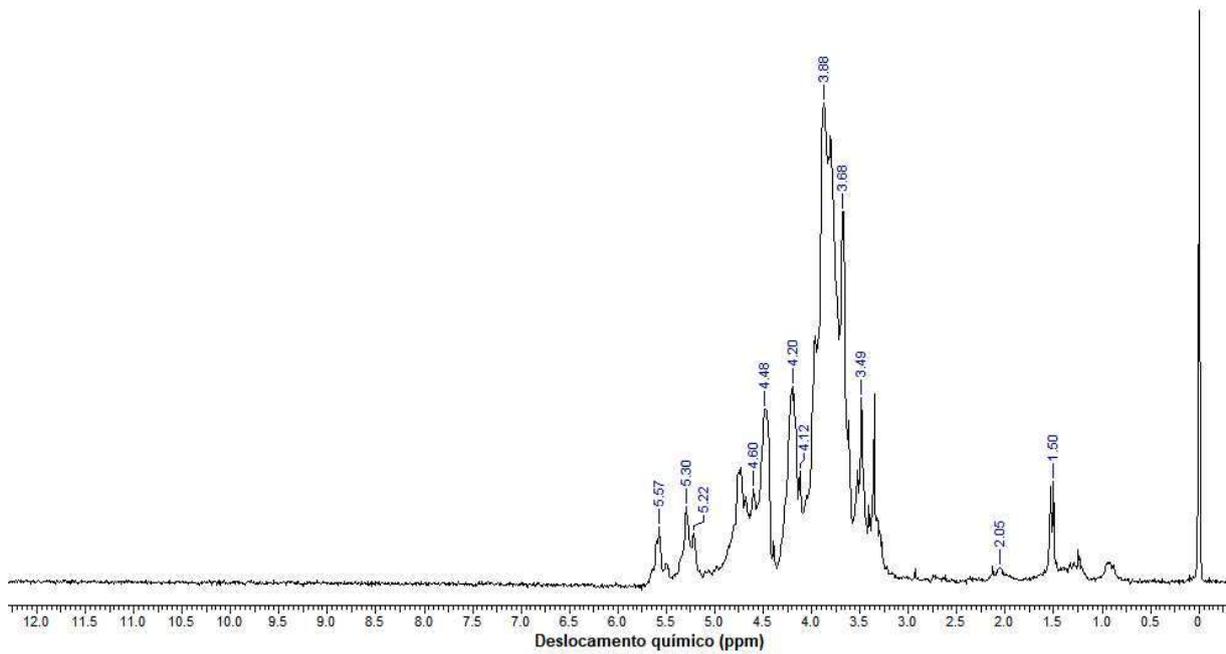


Figura 14- Espectro de RMN de ^{13}C do polissacarídeo extraído de *Asparagopsis armata* Harvey

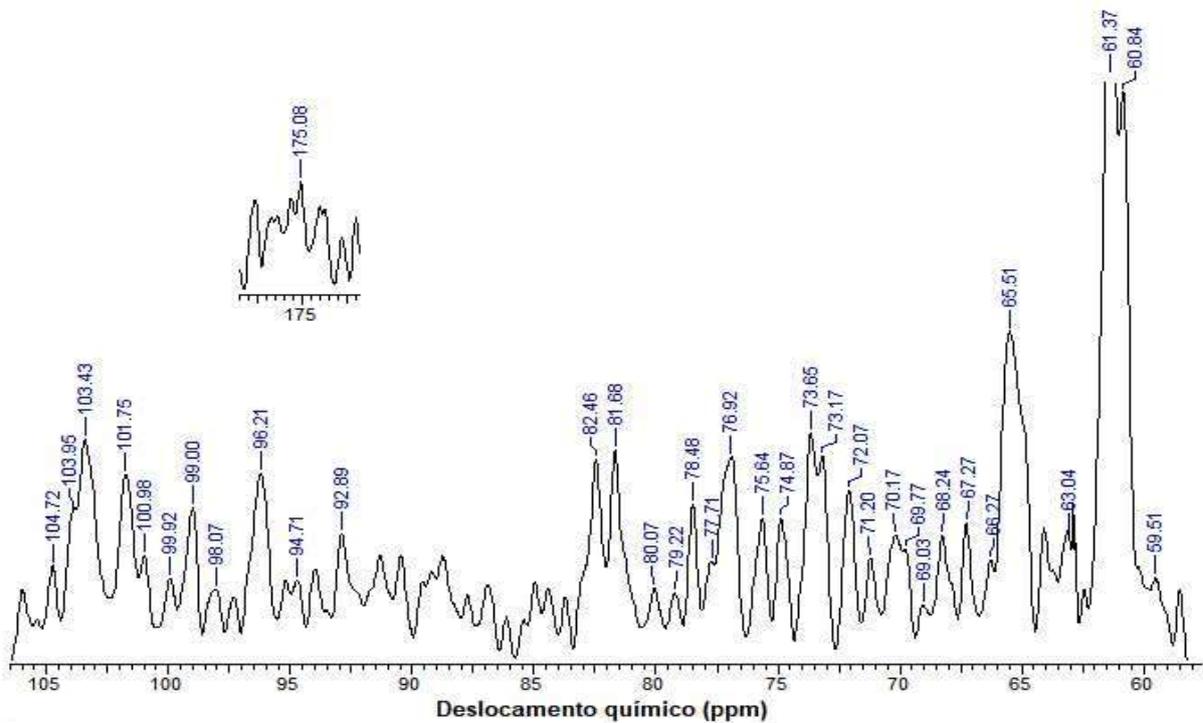
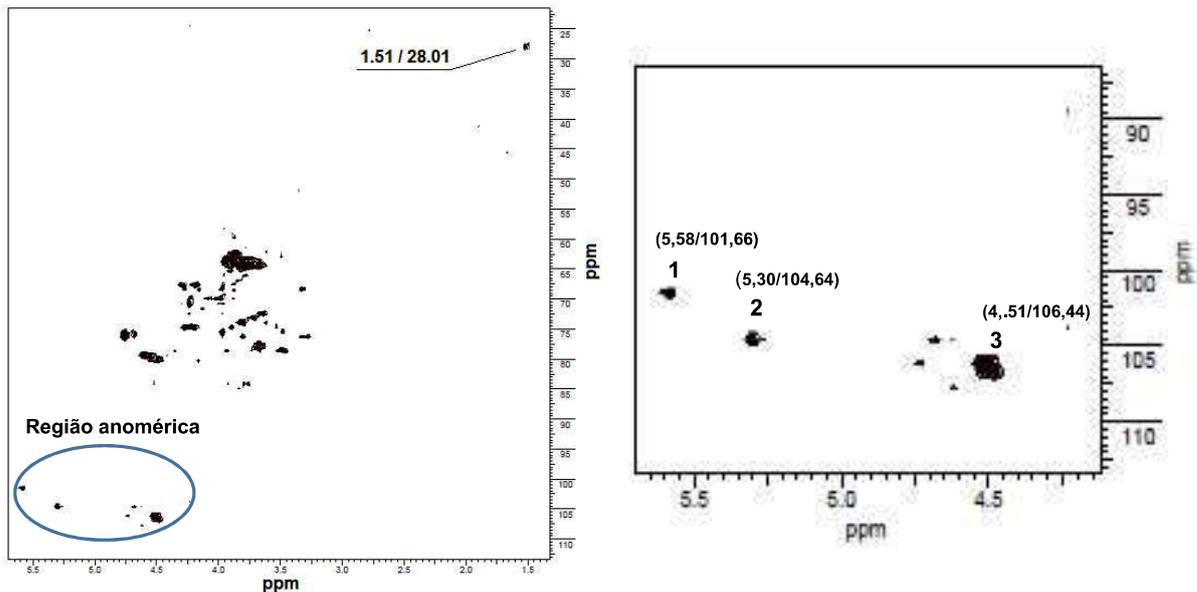


Figura 45- Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC do polissacarídeo extraído de PST-Aa



Fonte: Elaborado pelo autor

Além disso, na tabela 4 são mostrados os deslocamentos químicos de (H1-C1) δ 4,60/101,73 ppm; (H2-C2) δ 3,68/70,17 ppm; (H3-C3) δ 3,35/82,46 ppm; (H4-C4) δ 4,12/69,03 ppm; (H5-C5) δ 3,68/72,07 ppm; (H6-C6) δ 3,49/59,51 ppm, atribuídos à unidades metiladas de Galp (β -D-Galp-6-O-CH₃) (ZANG et al, 2005).

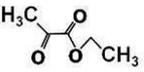
Na tabela 5, ainda são encontrados os demais deslocamentos químicos (δ) descritos e reportados na literatura, com referência aos RMN 1D e 2D, para os outros carbonos do anel galactopiranosídico (Galp) de carragenanas e agaranas, encontrados nas díades em PST-Aa.

Tabela 4- Deslocamentos químicos de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC para as unidades estruturais de carragenana e agarana mais comuns encontradas para PST Aa.

DESLOCAMENTO QUÍMICO de RMN ^{13}C e RMN HSQC (ppm)												
POSSÍVEIS ESTRUTURAS BÁSICAS DAS DIÁDES DE CARRAGENANA e AGARANA EM PTS-Aa												
RMN ^{13}C das Diádes	G4SDA2S ^z ftzq (C. <i>Iota</i> ciclizada)		G4SDA ^{az} ftzq (C. <i>Kappa</i> ciclizada)		G4SD2S6S ^b chft (C. <i>Nu</i>)		G4SD6S ^b cft (C. <i>Mu</i>)		GLA ^{dft} q (Agarana ciclizada)		GL6S ^{dft} q (Agarana)	
	C ^{G4S}	C ^{DA2S}	C ^{G4S}	C ^{DA}	C ^{G4S}	C ^{D2S6S}	C ^{G4S}	C ^{D2S}	C ^G	C ^{LA}	C ^G	C ^{L6S}
C1 e C1	104,72	96,21	101,72	94,71	104,64	98,07	101,66	92,89	103,95	100,98	103,42	99,92
C2 e C2	70,21	69,03	69,77	nd	70,99	76,25	78,05	70,21	nd	70,29	nd	70,99
C3 e C3	79,22	nd	80,07	79,62	78,48	68,24	77,71	76,92	81,68	nd	81,68	71,20
C4 e C4	66,27	78,48	74,13	78,84	70,99	nd	74,91	74,87	68,64	68,56	68,64	65,51
C5 e C5	75,64	69,77	72,56	76,48	74,91	68,64	73,17	68,64	74,13	75,64	74,91	72,56
C6 e C6	61,37	nd	68,24	69,77	61,37	67,85	69,29	61,24	60,84	61,37	61,37	67,85

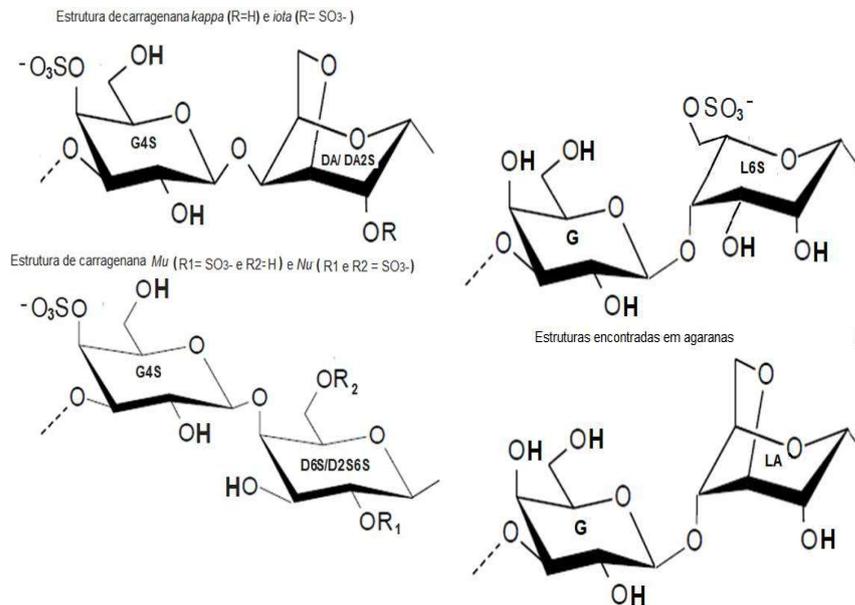
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Estruturas das diádes de polissacarídeos de *Asparagopsis armata*. 3-Ligado- β -D-Galp-4S (G4S); 4-Ligado-3,6 anidro- α -D-Galp-2S (DA2S); 4-Ligado-3,6 anidro- α -D-Galp(DA); 4-Ligado- α -D-Galp-2S6S (D2S6S); 4-Ligado- α -D-Galp-6S (D6S); 3-Ligado- β -D-Galp (G); 4-Ligado-3,6 anidro- α -L-Galp (LA); 4-Ligado- α -L-Galp-6S (L6S); a= valores reportados por: Liao et al 1996; b= valores reportados por: Ciancia et al 1993; c= valores reportados por: Miller e Blunt, 2002; d=valores reportados por: Lahaye, Yaphe e Rochas, 1985; f=valores reportados por: Estevez, Ciancia e Cerezo, 2008; h= valores reportados por: Stortz 1994; q= valores reportados por: Usov, 1998; ;t= valores reportados por: Van de Valde et al 2002; z=valores reportados por: Falshaw, Furmeaux, e Wang, 2003; Usov, Yarotsky e Shashkov, 1980; nd= não detectado.

Tabela 5- Deslocamento químicos RMN de ^1H - ^{13}C HSQC para PST-Aa

RMN ^1H e ^{13}C e RMN HMQC dos substituintes em PTS Aa							
Unidade	H1/C1 (ppm)	H2/C2 (ppm)	H3/C3 (ppm)	H4/C4 (ppm)	H5/C5 (ppm)	H6/C6 (ppm)	Grupo substituinte s (ppm)
(Agarana) α - L-galp-6- sulfato	^b 5,22/ 99,00	nd	nd	nd	nd	^b 4,20/ 67,27	-
C1 de configuração β - glicosídica	^a 4,51/ 106,44	nd	nd	nd	nd	nd	-
β -D-Galp-O- CH3	^{hbc} 4,60/ 101,72	^{hbc} 3,68/ 70,17	^{hbc} 3,35/ 82,46	^{hbc} 4,12/ 69,03	^{hbc} 3,88/ 73,65	^{hbc} 3,68/ 72,07	^{bcd} f 3,49/ 59,51
-COOH Grupo carboxila	-	-	-	-	-	-	^g 175,08
 Metil- piruvato	-	-	-	-	-	-	^e 1,51 (1,50)/ 28,01
 acetil	-	-	-	-	-	-	^f 2,06/ nd

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: a = valor reportado por: Alrazem et al, 2007; b = valores reportados por: Estevez, Ciancia e Cerezo, 2008; c = valores reportados por: Falshaw, Furneaux e Wang, 2003; d = valores reportados por: Lahaye et al 1989; e = valores reportados por: Stephanie et al, 2010; f= valores reportados por: Lajili et al, 2019; g= valores reportados por: Gao et al, 2020; h= valores reportados por: Zang et al, 2005; nd = não determinado.

Figura 16- Esqueletos básicos encontrados das Díades formadoras de galactanas do tipo D/L Híbridas de PST-Aa

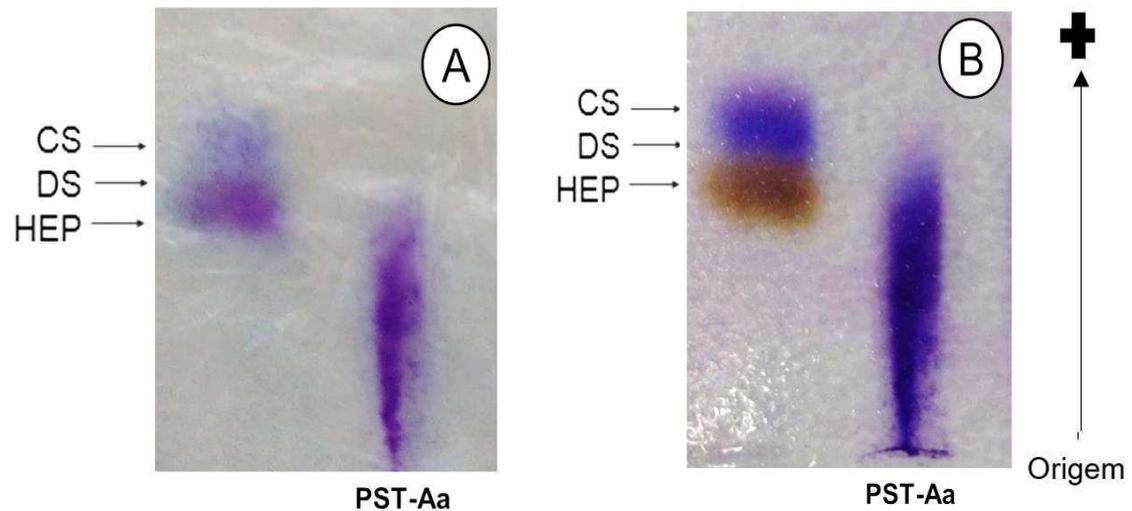


Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Estruturas das díades encontradas nos PST-Aa representando para as agaranas e carragenanas do tipo Kapaa, Mu e Nu.

6.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese apresentou bandas nítidas do PST-Aa no gel de agarose 0,5% garantida pela fixação do tampão 1,3 acetato diaminopropano. Com base na figura 17 é possível comprovar a presença de grupos sulfatados através da reação do corante azul de toluidina (Figura 17. A) que se liga as cargas aniônicas do PST-Aa, atribuindo uma coloração violeta. A reação de metacromasia também apresentou densidade de cargas na molécula de PST demonstrando a polidispersão em cargas no gel de agarose. A reação com o reagente stains-all em (Figura 17. B) confirmou a presença de grupos sulfatados no polímero de PST-Aa.

Figura 17- Eletroforese em gel de agarose 0,5% dos Polissacarídeos sulfatados de *Asparagopsis armata* Harvey

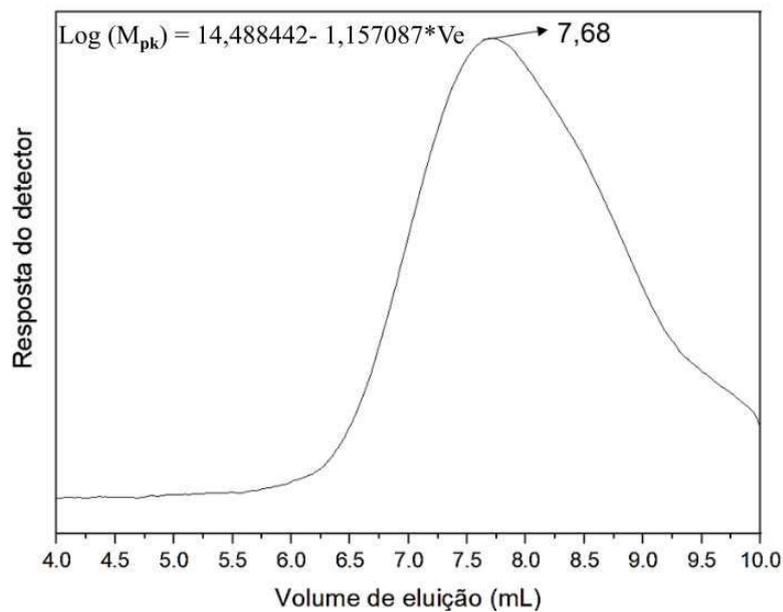


Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: CS: Codroitim sulfato; DS: Dermatan sulfato; HEP: Heparina. A: amostras coradas com azul de toluidina 0,1%; B: amostras coradas com Stains-all.

6.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

O perfil cromatográfico do PST-Aa está representado na figura 18, com a demonstração de um único pico com volume de eluição de 7,68 mL no seu ápice. Para realização da curva de calibração foram utilizadas pululanas que são polissacarídeos neutros com diferentes valores de massas molares que variam de 10^3 a 10^6 g.mol⁻¹. A massa molecular que corresponde ao PST-Aa foi de 332.7 KDa ou seja $3,32 \times 10^5$.

Figura 58- Perfil cromatográfico dos polissacarídeos sulfatados de *A. armata* Harvey



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Representação do volume de eluição obtido do detector de cromatograma de permeação em gel.

6.5 Avaliação do efeito neuroprotetor dos PST-Aa no modelo da Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA

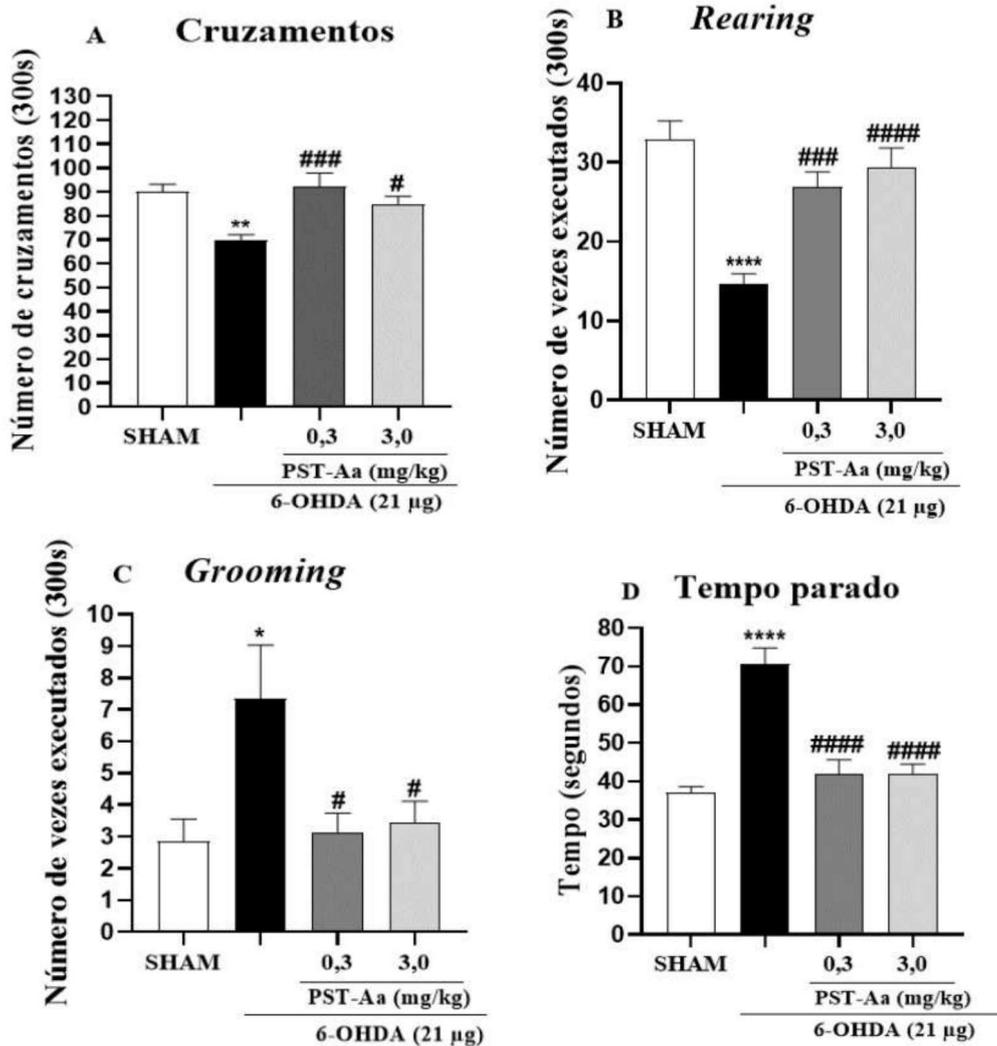
6.5.1 Campo aberto

A atividade locomotora dos animais foi analisada através do teste de campo aberto demonstrada na figura 19. Observou-se que o grupo II submetido a lesão por 6-OHDA, (controle positivo) apresentou uma diminuição significativa de 22,27% no número de cruzamentos ($69,86 \pm 2,22$) quando comparado ao grupo I sham ($89,86 \pm 3,32$ números de cruzamentos). Observou-se que a atividade locomotora dos grupos III e IV, tratados com a dose de PST-Aa 0,3 mg/kg ($92,31 \pm 5,52$ números de cruzamentos) e 3,0 mg/kg ($84,86 \pm 3,26$ números de cruzamentos) apresentaram um aumento significativo de 32,12% e 21,45% no número de cruzamentos em relação ao grupo II 6-OHDA (controle positivo).

A análise da atividade exploratória vertical, *rearings* (levantamentos sobre as patas traseiras), foi realizada levando em consideração o número de vezes que os animais executaram esse comportamento. Observou-se que o grupo II 6-OHDA (controle positivo) apresentou uma redução de 55,34% no número de *rearings* ($14,69 \pm 1,25$ *rearings*) quando comparado com os animais do grupo sham (salina 0,9%) ($32,92 \pm 2,32$ *rearings*). Os grupos tratados com o PST-Aa nas doses de 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, apresentaram um número de *rearings* 83,16% ($26,92$

$\pm 1,89$ rearings) e 100,54% ($29,46 \pm 2,40$ rearings) maior que o grupo 6-OHDA, mostrando que o tratamento conseguiu reverter significativamente os danos causados pela 6-OHDA.

Figura 69- Atividade locomotora no teste do Campo aberto



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os ratos (n=14 animais *per* grupo, machos pesando aproximadamente 250-290g) foram lesionados no estriado direito com 6-OHDA através de cirurgia estereotaxica, e 24h depois tratados com PST-Aa (0,3 e 3,0 mg/kg) ou salina (0,9%). Após 14 dias de tratamentos, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto para análise dos seguintes parâmetros: número de cruzamentos (A), número de rearing (B), número de comportamento de autolimpeza (C) e tempo parado (D). Os dados estão expressos em média \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni *, ** e **** indicam $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,0001$ respectivamente em relação ao grupo Sham. #, ### e #### indicam $P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$ em relação ao grupo 6-OHDA (21 µg).

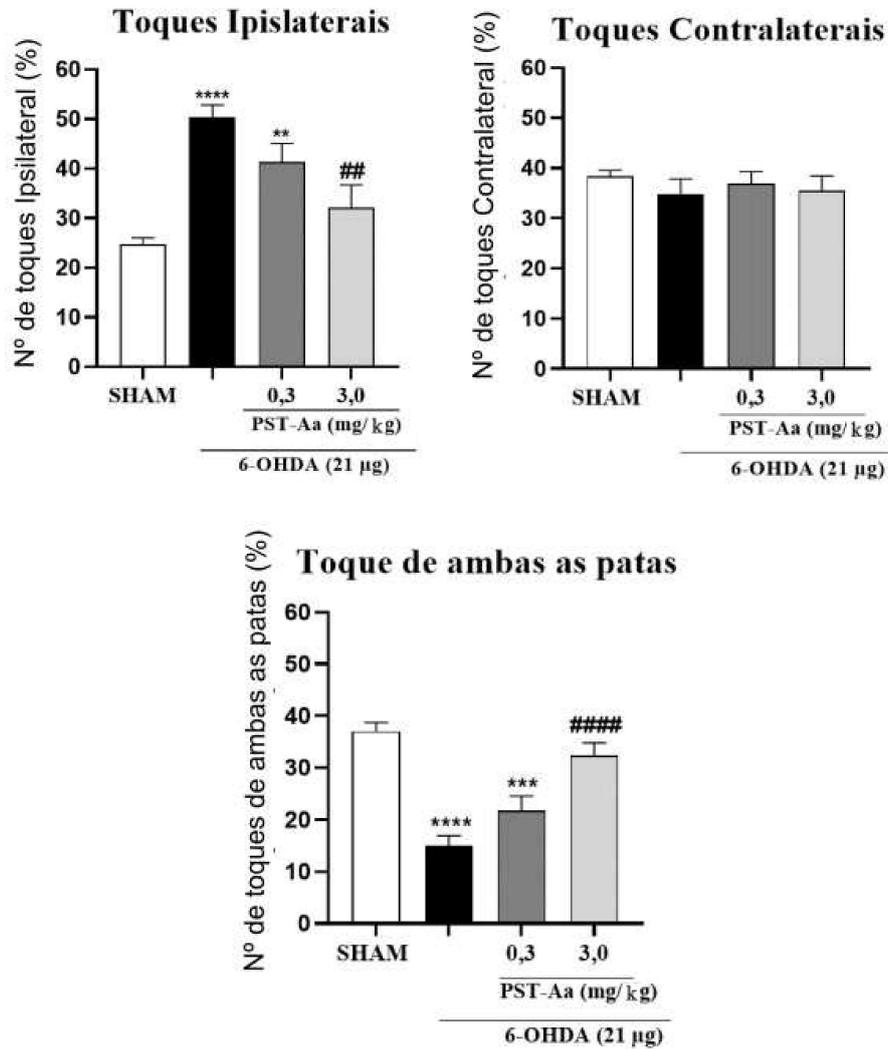
Na avaliação do comportamento de autolimpeza (*Grooming*) foi observado um aumento significativo de 157,34% dessa atividade nos animais do grupo II 6-OHDA ($7,36 \pm 1,68$ *grooming*) em relação ao grupo sham ($2,86 \pm 0,69$ *grooming*). Por outro lado, esse comportamento foi reduzido em 57,24% nos grupos tratados com PST-Aa 0,3 mg/kg ($3,14 \pm 0,59$ *grooming*) e 53,37% nos grupos tratados com PST-Aa 3,0 mg/kg ($3,43 \pm 0,68$ *grooming*) em relação ao grupo 6-OHDA.

Foi avaliado o parâmetro de imobilidade dos animais no campo aberto. Os animais do grupo lesionados com 6-OHDA ($70,51 \pm 4,31$ s) apresentaram um aumento significativo de 90,20% em relação ao grupo I Sham (salina 0,9%) ($37,06 \pm 1,24$ s). Contudo, as doses de PST-Aa 0,3 mg/kg ($41,82 \pm 3,81$ s) e 3,0 mg/kg ($42,11 \pm 2,41$ s) reduziram significativamente o tempo de imobilidade em 40,66% e 40,24% respectivamente em relação aos grupos 6-OHDA.

6.5.2 Teste do Cilindro

O teste do cilindro demonstrou que os animais tratados com os PST-Aa na dose 0,3 mg/kg (% Contralateral: $36,96 \pm 2,37$ tempo executado) e 3,0 mg/kg (% Contralateral: $35,54 \pm 2,89$ tempo executado) não alterou o número de toques com a pata contralateral em comparação com os animais 6-OHDA (% Contralateral: $34,78 \pm 3,02$ tempo executado) demonstrado na figura 20. Contudo, houve um aumento no número de toques com ambas as patas nos animais tratados nas doses 0,3 mg/kg (%ambos: $21,73 \pm 2,86$ tempo executado) e 3,0 mg/kg ($P < 0,0001$) (% ambos: $32,34 \pm 2,47$ tempo executado) de 45,74% e 117,04% respectivamente em relação aos animais 6-OHDA (% ambos: $14,91 \pm 2,00$ tempo executado). Os animais 6-OHDA (% Ipsilateral: $50,31 \pm 2,52$ tempo executado) apresentaram uma maior atividade com a pata ipsilateral em relação aos PST-Aa nas doses 0,3 mg/Kg ($P < 0,05$) (% Ipsilateral: $41,34 \pm 3,74$ tempo executado) e 3,0 mg/Kg (% Ipsilateral: $32,11 \pm 4,61$ tempo executado).

Figura 20- Atividade do Cilindro



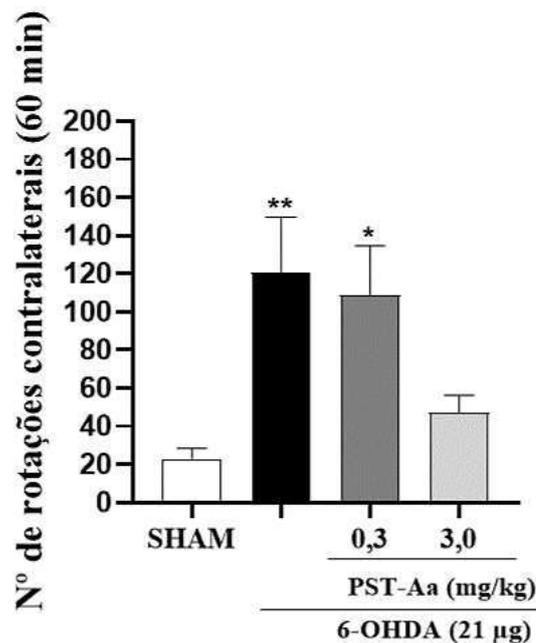
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os animais ($n = 14$ per grupo) lesionados com a 6-OHDA foram submetidos ao teste do cilindro no 14º dia, 1h após o último dia tratamento. Os parâmetros avaliados foram observados como número de toques com as patas ipsilateral (A), pata contralateral (B) e ambas as patas (C), durante 5 min. Os valores estão representados como média \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni ** , *** e **** indicam $P < 0,01$, $P < 0,001$ e $P < 0,0001$ respectivamente em relação ao grupo Sham. ## e #### indica $P < 0,01$ e $P < 0,001$ em relação ao grupo 6-OHDA (21µg).

6.5.3 Teste da Apomorfina

O teste de validação do modelo da Doença de Parkinson foi mensurado através da aplicação do agonista apomorfina (3mg/kg i.p) demonstrado na figura 21. Os resultados mostraram que os animais submetidos a lesão unilateral estriatal de 6-OHDA ($120,4 \pm 29,38$ rotações/h) elevaram em 424,88% o número de rotações contralaterais a lesão estriatal quando comparado ao grupo sham ($22,93 \pm 5,50$ rotações/h). Em contrapartida, os animais tratados com o PST-Aa 3,0 mg/kg ($47,00 \pm 9,26$ rotações/h) foram capazes de reduzir em 61% o número de rotações contralaterais em relação ao grupo 6-OHDA. Após a análise dos resultados, constatou-se que para obter um efeito mais potente na dose PST-Aa 0,3 mg/kg ($108,9 \pm 25,69$ rotações/h) é imprescindível um aumento na concentração de polissacarídeos administrada nos animais.

Figura 21- Teste Rotacional induzido por Apomorfina



Fonte: Elaborado pelo autor.

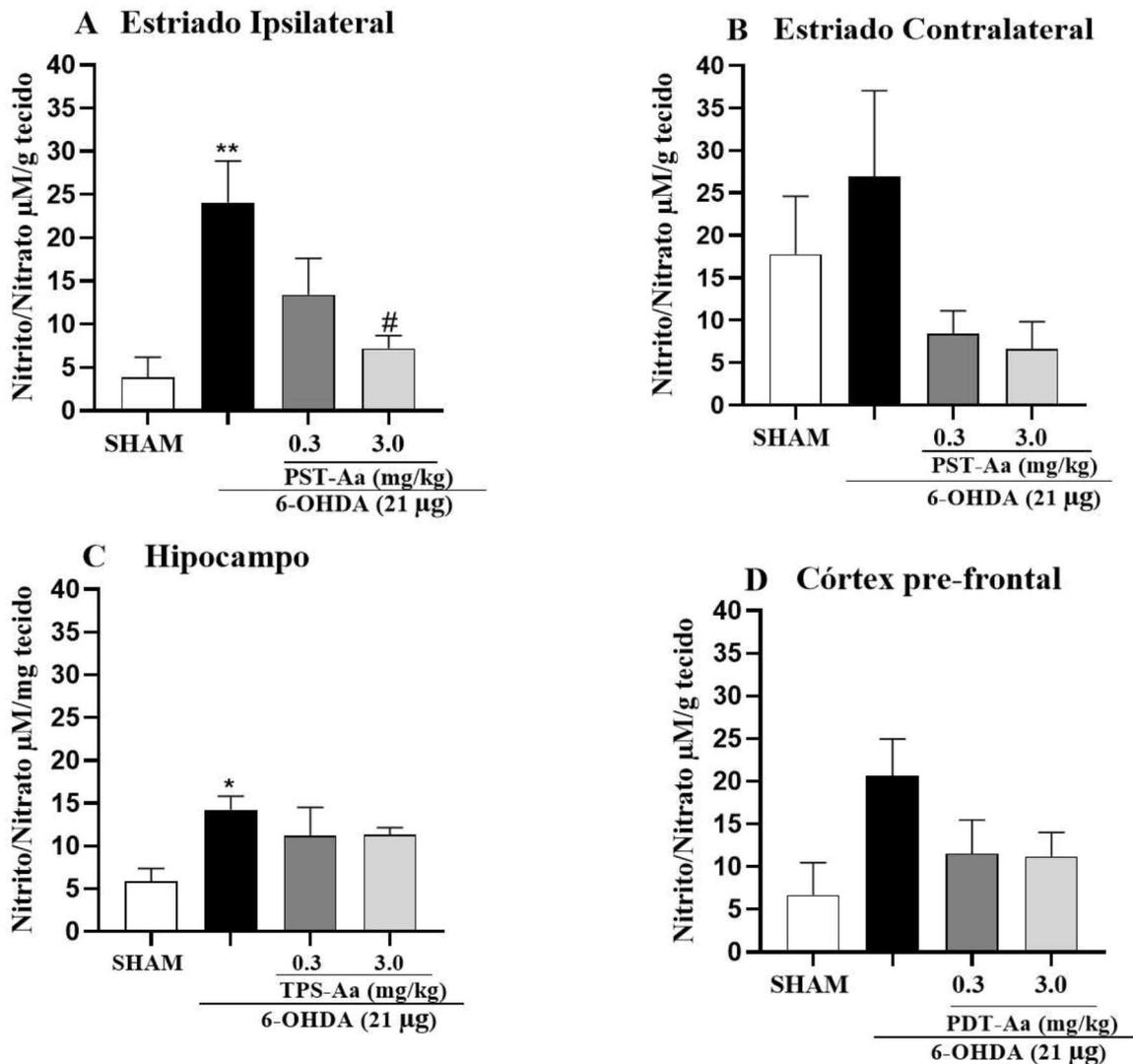
Legenda: Os animais ($n= 14$ per grupo) lesionados com a 6-OHDA foram submetidos ao teste da apomorfina (3mg/kg i.p) no 14º dia de tratamento. Foram avaliados o número de rotações contralaterais num período de 60 min. Os valores estão representados como média \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni * e ** indicam $P<0,05$ e $P<0,01$ respectivamente em relação ao grupo Sham.

6.6 Dosagens neuroquímicas

6.6.1 Determinação da concentração de nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3) das regiões encefálicas

Os resultados obtidos da concentração dos níveis de nitrito e nitrato das regiões encefálicas dos animais podem ser observados na figura 22. Com base nos gráficos representados, observa-se que os animais lesionados com a 6-OHDA apresentou um aumento significativo dos níveis de nitrito/nitrato na região do hipocampo ($14,24 \pm 1,57 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido) quando comparado com o grupo sham (hipocampo $5,86 \pm 1,51 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido). Os animais tratados com as doses de polissacarídeos de *A. armata* 0,3 mg/kg (hipocampo $11,21 \pm 3,31 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido) e 3,0 mg/kg (hipocampo $11,31 \pm 0,82 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido) não apresentaram efeitos significativos nos níveis de nitrito/nitrato. Os animais do grupo 6-OHDA apresentaram aumento nos níveis de nitrito/nitrato em todas as demais áreas cerebrais testadas, no corpo estriado ipsilateral ($24,09 \pm 4,78 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido), corpo estriado contralateral ($26,87 \pm 10,18 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido) e lobo pré-frontal ($20,66 \pm 4,32 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido). Apenas a dose de PST-Aa na concentração de 3,0 mg/kg foi capaz de promover uma diminuição significativa dos níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado direito ($13,40 \pm 4,21 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido) quando comparado ao grupo 6-OHDA. Nas demais áreas analisadas as doses de PST-Aa 0,3 mg/kg (corpo estriado esquerdo $8,43 \pm 2,68 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido), (córtex pré-frontal $11,55 \pm 3,93 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido) e PST-Aa 3,0 mg/kg (corpo estriado direito $7,172 \pm 1,51 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido), (corpo estriado esquerdo $6,67 \pm 3,194 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido), (córtex pré-frontal $11,21 \pm 2,82 \mu\text{M}/\text{mg}$ de tecido) demonstraram redução nos níveis nitrosativos, no entanto não foram capazes de promover um efeito significativo.

Figura 72- Análises neuroquímicas de nitrito/nitrato das regiões encefálicas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os animais ($n= 14$ per grupo) foram lesionados com a 6-OHDA no estriado direito e após tratados com os PST-Aa nas doses 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg ou salina 0,9% durante 14 dias. Após os testes comportamentais no 15º dia os animais foram eutanasiados por decapitação e logo em seguida foram separadas as seguintes regiões encefálicas: (A) Hipocampo, (B) Córtex pré-frontal, (C) Corpo estriado ipsilateral e (D) Corpo estriado contralateral para análise das concentrações de nitrito/nitrato. Os valores estão representados como média \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni * e ** indicam $P<0,05$ e $P<0,01$ respectivamente em relação ao grupo Sham. #. indicam $P<0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA (21 µg).

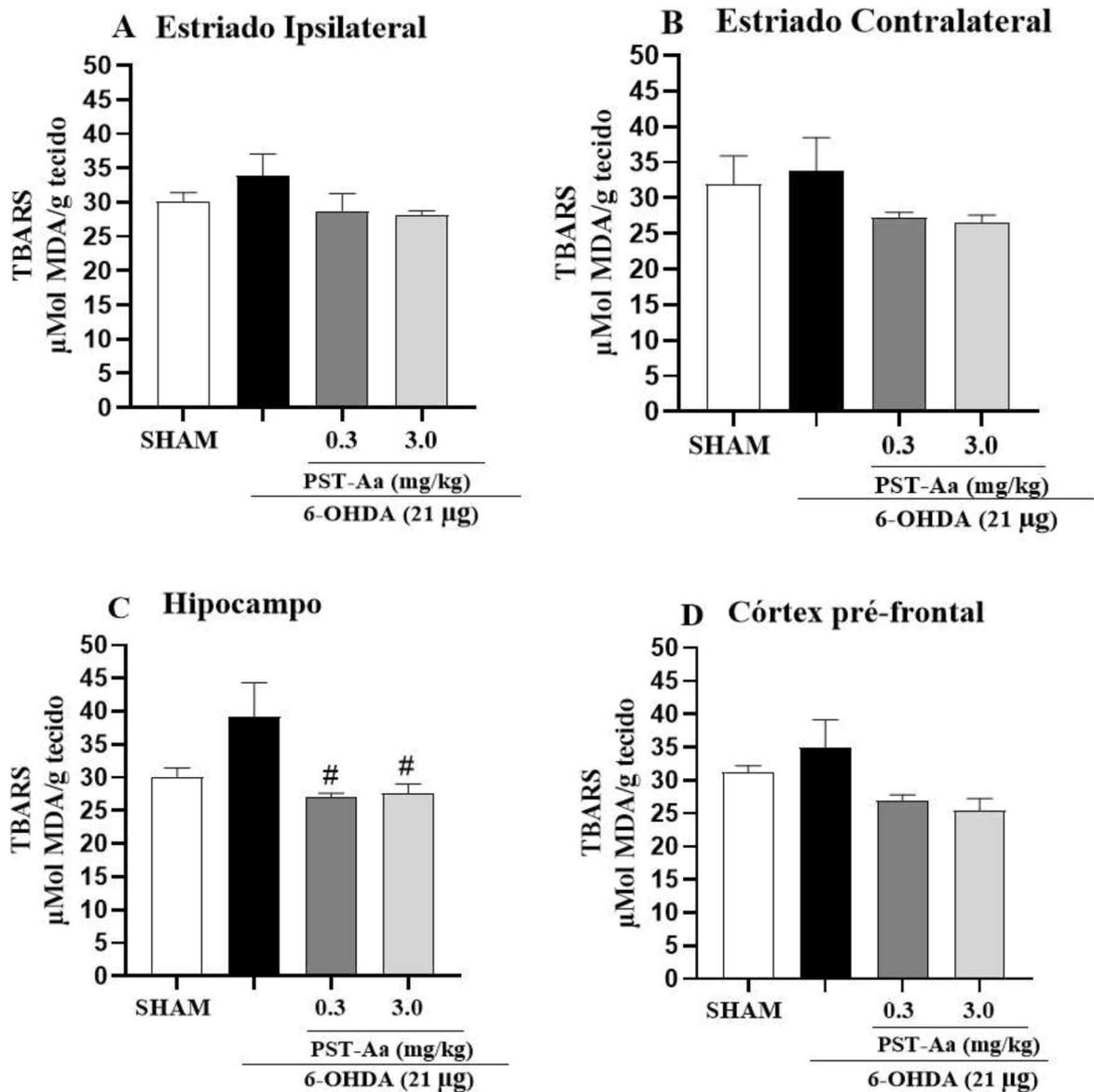
6.6.2 Determinação dos níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) das regiões encefálicas

O efeito antioxidante dos PST-Aa foi avaliado por meio do teste do TBARS, onde foram quantificados os níveis de malondialdeído (MDA), um produto resultante da peroxidação

lipídica que ocorre pela interação do ácido tiobarbitúrico. De acordo com a figura 23, os animais lesionados com a 6-OHDA apresentaram um aumento de MDA em todas as áreas encefálicas analisadas (hipocampo $39,23 \pm 5,10$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido), (corpo estriado direito $33,93 \pm 3,15$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido), (corpo estriado esquerdo $33,81 \pm 4,67$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido) e (córtex pré-frontal $35,00 \pm 1,87$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo controle sham (salina 0,9%) (hipocampo $30,10 \pm 1,34$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido), (corpo estriado direito $30,10 \pm 1,37$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido), (corpo estriado esquerdo $31,88 \pm 4,01$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido) e (córtex pré-frontal $31,21 \pm 0,99$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido).

A dose de PST-Aa 0,3 mg/kg na região do (hipocampo $26,98 \pm 0,68$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido) e 3,0 mg/kg (hipocampo $27,65 \pm 1,37$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido) apresentaram uma diminuição nos níveis de MDA quando comparado ao grupo 6-OHDA. Contudo, não houve diferenças significativas para as demais regiões encefálicas nas doses de PST-Aa 0,3 mg/kg (corpo estriado direito $28,76 \pm 2,52$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido), (corpo estriado esquerdo $27,20 \pm 0,77$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido), (córtex pré-frontal $26,98 \pm 0,814$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido) e PST-3,0 mg/kg (corpo estriado direito $28,17 \pm 0,60$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido), (corpo estriado esquerdo $26,54 \pm 1,06$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido), (córtex pré-frontal $25,42 \pm 1,87$ $\mu\text{Mol MDA/g}$ de tecido).

Figura 23- Análises neuroquímicas de Peroxidação Lipídica das regiões encefálicas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os animais ($n= 14$ per grupo) foram lesionados com a 6-OHDA no estriado direito e após tratados com os PST-Aa nas doses 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg ou salina 0,9% durante 14 dias. Após os testes comportamentais no 15º dia os animais foram eutanasiados por decapitação e logo em seguida foram removidas as seguintes regiões encefálicas: (A) Hipocampo, (B) Córtex pré-frontal, (C) Corpo estriado ipsilateral e (D) Corpo estriado contralateral para análise das concentrações de nitrito/nitrato. Os valores estão representados como média \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni # indicam $P<0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA (21 μ).

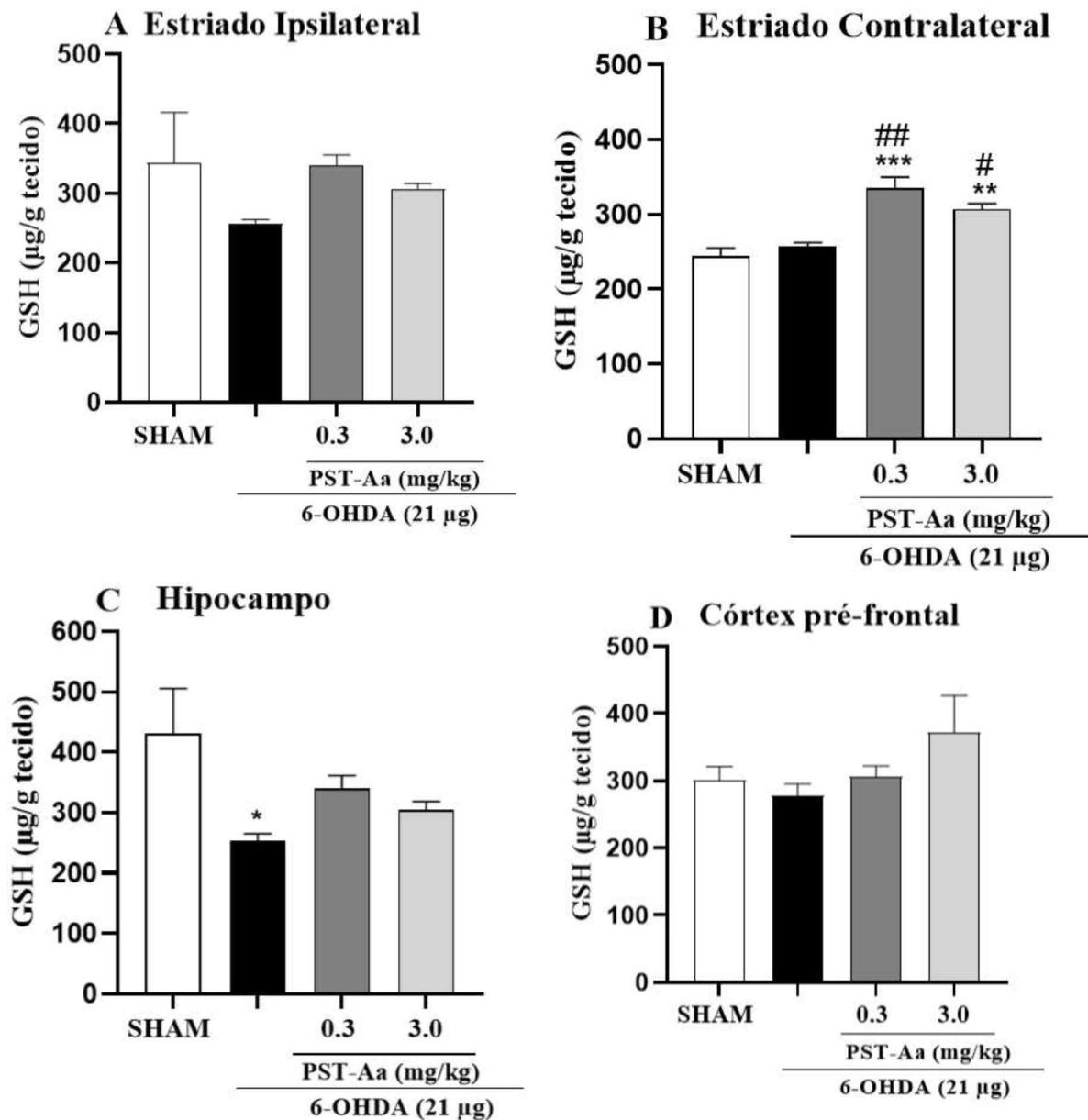
6.6.3 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida das regiões encefálicas

As análises antioxidantes realizada através da dosagem de glutathiona reduzida representada na figura 24. Os animais submetidos a lesão 6-OHDA demonstraram uma redução da atividade enzimática de glutathiona na região do hipocampo ($253,9 \pm 11,49$ μ g/g de tecido) e

corpo estriado Ipsilateral ($257,4 \pm 5,03 \mu\text{g/g}$ de tecido) e córtex pré-frontal ($277,2 \pm 17,87 \mu\text{g/g}$ de tecido) quando comparado ao grupo sham que apresentou uma atividade maior no hipocampo ($431,1 \pm 74,47 \mu\text{g/g}$ de tecido), corpo estriado ipsilateral ($344,3 \pm 71,78 \mu\text{g/g}$ de tecido) corpo estriado contralateral ($244,4 \pm 10,86 \mu\text{g/g}$ de tecido).

As doses de polissacarídeos na concentração de 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg apresentaram um aumento nos níveis de glutathiona reduzida nas áreas do hipocampo (PST-Aa 0,3 mg/kg $340,4 \pm 21,55 \mu\text{g/g}$ de tecido) e (PST 3,0 mg/kg $304,9 \pm 13,76 \mu\text{g/g}$ de tecido), no corpo estriado contralateral foi observado um aumento significativo nos níveis de glutathiona reduzida nos grupos de PST-Aa 0,3 mg/kg ($334,7 \pm 15,13 \mu\text{g/g}$ de tecido) e PST-Aa 3,0 mg/kg ($306,8 \pm 7,45 \mu\text{g/g}$ de tecido) maior que os níveis de GSH apresentados pelos animais do grupo sham (salina 0,9%) ($244,4 \pm 10,86 \mu\text{g/g}$ de tecido). Na região do corpo estriado Ipsilateral foi observado um aumento nos níveis de glutathiona nos grupos de PST-Aa 0,3 mg/kg (corpo estriado ipsilateral $341,2 \pm 13,97 \mu\text{g/g}$ de tecido) e PST-Aa 3,0 mg/kg (corpo estriado ipsilateral $306,8 \pm 7,44$) quando comparado ao grupo 6-OHDA ($257,4 \pm 5,03 \mu\text{g/g}$ de tecido), porém esse efeito dos polissacarídeos não foi considerado significativo.

Figura 24- Análises neuroquímicas de Glutathiona reduzida das regiões encefálicas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os animais ($n= 14$ *per* grupo) foram lesionados com a 6-OHDA no estriado direito e após tratados com os PST-Aa nas doses 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg ou salina 0,9% durante 14 dias. Após os testes comportamentais no 15º dia os animais foram eutanasiados por decapitação e logo em seguida foram separadas as seguintes regiões encefálicas: (A) Hipocampo, (B) Córtex pré-frontal, (C) Corpo estriado ipsilateral e (D) Corpo estriado contralateral para análise das concentrações de nitrito/nitrato. Os valores estão representados como média \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni ** e *** indicam $P<0,01$ e $P<0,001$ respectivamente em relação ao grupo Sham. # e ## indicam $P<0,05$ e $P<0,01$ em relação ao grupo 6-OHDA (21µ).

7 DISCUSSÕES

O método de extração dos polissacarídeos sulfatados (PST-Aa) baseou-se na abordagem enzimática utilizando a papaína como a enzima proteolítica. A papaína é responsável pela quebra das proteínas presentes na parede celular da alga, viabilizando o isolamento dos PST-Aa. Através desse processo, obteve-se um rendimento de 682,1 mg de PST-Aa, correspondendo a 13,64% da quantidade de 5 g de alga seca utilizada. Esse método de extração é amplamente adotado devido ao seu baixo custo e facilidade de reprodução. (Farias et al., 2000).

O rendimento dos PST-Aa obtidos neste estudo mostrou-se consistente com os de outras espécies de algas vermelhas utilizando o mesmo método de extração enzimática. Por exemplo, a espécie *Gracilaria cornea*, quando coletada em leite natural, obteve um rendimento de $15,70 \pm 1,822\%$ (RODRIGUES et al., 2017), e a espécie *Gracilaria intermedia* alcançou um rendimento em massa de PST de $17,0 \pm 1,18\%$ (CASTRO et al., 2018). Esses resultados corroboram a eficácia e a viabilidade do método empregado para a obtenção dos PST-Aa.

Foram encontrados rendimentos inferiores na extração enzimática dos polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria birdae*, com um valor de PST obtido de 4,66% (VANDERLEI et al., 2011). No entanto, rendimentos superiores podem ser observados em outros trabalhos. Por exemplo, Rodrigues et al. (2009) trabalhou com a alga vermelha *Halymenia pseudofloresia*, obtendo um rendimento de 47,14%. Além disso, o trabalho de Souza et al. (2018) extraiu polissacarídeos da alga vermelha *Hypnea musciformis*, apresentando um valor de 28% de rendimento.

Foram encontrados rendimentos variados na extração enzimática dos polissacarídeos sulfatados de diferentes algas vermelhas. A alga *Gracilaria birdae*, por exemplo, apresentou um valor de PST de 4,66% (VANDERLEI et al., 2011), enquanto o trabalho Souza et al. (2018) com a alga *Hypnea musciformis* resultou em um rendimento de 28% de polissacarídeos. Além disso, o estudo de Rodrigues et al. (2009) com a alga *Halymenia pseudofloresia* obteve um rendimento mais elevado de 47,14%. Essa variação nos rendimentos destaca a influência da espécie de alga utilizada e a importância de ajustar os métodos de extração conforme a especificidade do estudo.

Essa variação no rendimento dos polissacarídeos sulfatados pode ser influenciada por diversos fatores, como o período de coleta, o estágio de vida da alga, variações sazonais e o tipo de método de extração utilizado. A literatura oferece diferentes métodos de extração,

cada um com o objetivo de extrair macromoléculas específicas. A escolha do método de extração é uma etapa crucial no processo de isolamento e caracterização bioquímica dos polissacarídeos. Essa consideração cuidadosa sobre o método de extração contribui para resultados mais precisos e consistentes, permitindo uma melhor compreensão das propriedades e aplicações dos polissacarídeos de diferentes espécies de algas marinhas (WASSIE et al., 2021).

Os polissacarídeos sulfatados de *A. armata*, após a determinação dos teores de carboidratos totais pelo método de Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013), apresentaram teores de carboidratos solúveis de 53,20%. Esse teor de carboidratos foi semelhante ao encontrado na alga vermelha *Solieria chordalis* (51,58%) (STEPHANIE et al., 2010) e na *Pterocladia capillacea* (59,91%) (ISMAIL; AMER, 2021). Teores de carboidratos solúveis com rendimentos inferiores foram encontrados nas algas vermelhas *Gracilaria ornata* (33,14%) e *Corallina officinalis* (42,73%) (AMORIM et al., 2012; ISMAIL; AMER, 2021). Por outro lado, outros trabalhos com algas vermelhas obtiveram resultados superiores, como na *Agardiella ramosíssima* (64,4%) (BATISTA et al., 2014), *Gelidiella acerosa* (89,5%) (CHAGAS, 2018) e *Hypnea musciformis* (98%) (SOUZA et al., 2016). Esses dados refletem a diversidade nos teores de carboidratos solúveis presentes em diferentes espécies de algas, destacando a importância de avaliar as características estruturais e bioquímicas de cada alga em pesquisas sobre polissacarídeos.

Os teores de sulfatos livres dos polissacarídeos sulfatados de *A. armata* foram de 30,29%. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Andrade (2016), que estudou a espécie de alga vermelha *Solieria filiformis* utilizando o mesmo método de Dodgson e Price (1961), obtendo um resultado equivalente de 35,89%. No estudo de Gong et al. (2021), com a alga vermelha *Gracilaria lemaneiformis*, foi encontrado um percentual de sulfato de 33,84%. Esses resultados indicam que o polissacarídeo de *A. armata* possui uma estrutura química semelhante à família de carragenófitas, uma vez que os grupos de sulfatos, de acordo com a literatura, podem constituir de 15% a 40% da massa do galactano (SALURI et al., 2021).

Teores de sulfatos livres com rendimentos inferiores aos obtidos no presente estudo podem ser observados no trabalho de Silva, (2019) com a alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* à qual apresentou rendimento de 3% e o resultado obtido no estudo de Coura et al., (2012) com a espécie de alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* cujo resultado foi de 15,66% do extrato bruto.

Os teores de sulfatos livres nos polissacarídeos sulfatados de *A. armata* foram de 30,29%. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Andrade (2016) com a alga vermelha *Solieria filiformis*, utilizando o mesmo método de Dodgson e Price (1961), obtendo um resultado equivalente de 35,89%. Além disso, Gong et al. (2021), em seu estudo com a alga vermelha *Gracilaria lemaneiformis*, encontraram um percentual de sulfato de 33,84%. Esses resultados indicam que o polissacarídeo de *A. armata* possui uma estrutura química semelhante à família de carragenófitas, uma vez que os grupos de sulfatos, de acordo com a literatura, podem constituir de 15% a 40% da massa do galactano (SALURI et al., 2021).

Por outro lado, teores de sulfatos livres com rendimentos inferiores aos obtidos no presente estudo foram observados no estudo de Coura et al. (2012) com a espécie de alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*, cujo resultado foi de 15,66% do extrato bruto e no trabalho de Silva (2019) com a alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, com rendimento de 3%. Essas variações nos teores de sulfatos livres evidenciam a diversidade nas composições químicas das diferentes espécies de algas e a influência dos métodos de extração utilizados nas análises.

A determinação de contaminantes proteicos solúveis nos PST-Aa mostrou-se ausente, o que está em concordância com outros estudos de obtenção de polissacarídeos sulfatados de outras espécies de algas que utilizaram a mesma metodologia de extração enzimática empregada neste trabalho, como os estudos de Chagas (2018) e Ribeiro (2016). Esses resultados indicam a eficácia do método de extração utilizado, garantindo a pureza dos polissacarídeos sulfatados obtidos.

A espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) importante na análise da estrutura química e dos grupos funcionais presentes nas unidades monoméricas dos polissacarídeos sulfatados. Essa técnica se baseia na interação da radiação de luz no infravermelho com as amostras, gerando vibrações nas moléculas que podem ser absorvidas ou transmitidas. O FT-IR é amplamente empregado em compostos naturais, proporcionando resultados confiáveis e requerendo um baixo consumo de amostras (MARIN, 2013). Essa abordagem é fundamental para caracterizar e compreender a estrutura química dos polissacarídeos sulfatados de *A. armata* Harvey, contribuindo para a elucidação de suas propriedades e potenciais aplicações.

O espectro dos PST-Aa apresentou picos que variaram desde as regiões de 3442 cm^{-1} a 580 cm^{-1} . As regiões de 3442 cm^{-1} e 2945 cm^{-1} indicam a presença de vibrações de

alongamento de grupos OH em cadeias alifáticas, o que é bastante comum para carboidratos. A banda característica da região 1652 cm^{-1} revela a presença do grupo carboxila na unidade monomérica do ácido glicurônico, demonstrando que o polissacarídeo de *A. armata* é composto por unidades heterogêneas em sua constituição (FIDELIS, 2014). Esses resultados fornecem informações cruciais sobre a estrutura química dos polissacarídeos sulfatados de *A. armata* Harvey.

A região 1420 cm^{-1} apresenta um dobramento na cadeia CH do esqueleto de galactana, com grupos sulfatados na constituição dessa cadeia (SHANURA FERNANDO et al., 2017; SELMI et al., 2021). O esqueleto de galactana é observado nas regiões 1053 cm^{-1} , e ainda um grupo sulfato presente no C-4 da D-galactose em 845 cm^{-1} . Os espectros nas regiões 845 cm^{-1} e 765 cm^{-1} revelaram que o polissacarídeo da referida alga apresenta estrutura muito semelhante a polímeros de galactanas híbridas, possuindo cadeias constituídas com monômeros de 3,6-anidrogalactose e galactose 4-fosfato na região 845 cm^{-1} (CHAVES, 2008; MARCIA et al., 2014).

Além disso, as bandas 1149 cm^{-1} , 1260 cm^{-1} e 580 cm^{-1} correspondem à presença de ésteres de sulfatos. Essas regiões de sulfatação encontradas no espectro estão de acordo com outros picos de polissacarídeos de algas vermelhas relatados na literatura (SOUZA, 2012). Esses resultados destacam a riqueza e a complexidade da estrutura química dos polissacarídeos sulfatados de *A. armata* Harvey, fornecendo informações importantes para a compreensão de suas propriedades biológicas.

Nesse estudo, observou-se que a unidade 3,6-anidrogalactose, presente tanto em agaranas quanto em carragenanas, foi identificada na região de 765 cm^{-1} . Isso demonstra que o PST-Aa possui uma estrutura bastante semelhante às galactanas híbridas D/L, conforme observado na literatura (TAKANO et al., 2003; HASLIN; LAHAYE; PELLEGRINI, 2000).

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) é amplamente empregada na caracterização estrutural de polissacarídeos sulfatados, permitindo a elucidação de informações valiosas sobre sequência, posições das ligações e padrões de substituição de grupos químicos (POMIN, 2014). Neste estudo, a RMN foi utilizada para identificar a natureza química dos polissacarídeos sulfatados de *A. armata*, contribuindo significativamente para a compreensão de sua estrutura molecular e propriedades biológicas.

Os espectros de RMN de ^1H ^{13}C e a técnica bidimensional de HSQC demonstraram que o polissacarídeo de *A. armata* possui uma estrutura constituída de díades galactopiranose

(Galp) para carragenanas e agaranas, conforme observado nas regiões δ 3,00 a δ 5,00 ppm no RMN H1 em H2, H3, H4, H5 e H6. Essas galactanas D/L-híbridas de PST-Aa são polissacarídeos estruturais encontrados em algas vermelhas, formando uma estrutura polimérica complexa através da combinação de díades (dissacarídeos) de carragenanas e agaranas, conforme relatado na literatura. De acordo com os dados obtidos na técnica de RMN e estudos anteriores, a cadeia principal dos PST-Aa é constituída pelas unidades 3- β -D-Galp-4-sulfato e 4- α -D/L galactopiranosose (GARON-LARDIERE, 2004).

Galactanos híbridos da série d/l já foi encontrado na literatura em polissacarídeos da alga vermelha *Gymnogongrus torulosus*, os quais apresentaram efeitos antivirais contra o vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2) em um modelo *in vitro* (PUJOL et al., 2002). Esses resultados contribuem para a compreensão da estrutura dos polissacarídeos sulfatados de *A. armata* e abre caminho para investigações futuras visando possíveis aplicações terapêuticas, o que pode trazer benefícios no desenvolvimento de novas terapias e tratamentos para diversas condições médicas, incluindo doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson.

A cadeia polissacarídica de PST-Aa apresentou como principais substituintes mais frequentes os grupos metila e ésteres de sulfato, conforme comprovado pela espectroscopia de infravermelho, que também indicou a presença de grupos piruvato e cetil. Além disso, na estrutura lateral do polímero, podem estar presentes grupos sulfatos ou metilas. O PST-Aa possui uma sequência regular, mas também pode conter outros monossacarídeos (unidades complementares) que contribuem para a formação do polímero, como unidades complementares para carragenanas, como D6S e D2S6S ou DA2S e DA (ciclizadas), ou unidades complementares para agaranas, como L6S ou LA (ciclizada) (USOV, 1998).

Além disso, as galactanas híbridas encontrada nos PST-Aa apresentam características semelhantes a carragenanas *Mu* e *Nu*, as quais são percussoras das carragenanas *kappa* e *iota*, respectivamente (Figura 1). Observa-se que ambas contêm na sua estrutura um grupo éster de sulfato na posição 6 de uma α -D-4-galactosil, isso permite a formação de dobras na cadeia polimérica facilitando a capacidade da carragenana de gelificar (USOV, 1998; FALSHAW, FURNEAUX E WONG, 2003).

A eletroforese em gel de agarose é um método de caracterização de macromoléculas capaz de identificar características físico-químicas presentes nas moléculas de polissacarídeos sulfatados. A metacromasia demonstrada nas amostras de PST-Aa revelou a presença de sulfatos, o que foi confirmado pelas técnicas de FT-IV, RMN e na dosagem de sulfato. Esses

resultados são consistentes com o trabalho de Andrade (2016), que analisou PST da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* nas mesmas condições eletroforéticas, demonstrando bandas carregadas e confirmando a presença de moléculas sulfatadas. A polidispersão em cargas apresentada pelo PST-Aa foi semelhante à da espécie *H. musciformis*, conforme descrito no trabalho de Matos (2020). Estes achados reforçam a relevância dos sulfatos na estrutura dessas macromoléculas e sua importância em processos biológicos específicos. Em razão da inexistência de padrões para polissacarídeos de algas marinhas, foi utilizado padrões obtidos de animais que são os glicosaminoglicanos os quais apresentam grupo sulfatado na sua estrutura sendo os mais conhecidos heparina (HEP), dermatan sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS). Observou-se que em comparações com os padrões animais os PST-Aa são bastante heterogêneos em cargas e com alta mobilidade (RODRIGUES et al., 2011; SONG; ZHANG; LINHARDT, 2021).

A massa molar do PST-Aa foi estimada por meio da técnica de Cromatografia de Permeação em Gel, que tem como objetivo separar moléculas com base em seus tamanhos. Os polissacarídeos sulfatados são considerados polímeros de grande massa molar e polidispersos, o que significa que esse valor pode variar consideravelmente (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; RUPÉREZ, 2012).

Em comparação com outros resultados de polissacarídeos de algas vermelhas, cujas massas molares foram semelhantes, um estudo realizado com o polissacarídeo da alga vermelha *Gracilaria caudata* apresentou uma massa molar de 250 KDa ou $2,5 \times 10^5$ (BARROS, 2011), enquanto o polissacarídeo da alga vermelha *Acanthophora spicifera* teve uma massa molar de 364 KDa. Valores de pesos moleculares inferiores foram observados na alga vermelha *Gelidium crinale*, cujo resultado foi de 25,77 kDa (PEREIRA; COSTA, 2018; PEI et al., 2021).

Essas variações nos pesos moleculares destacam a diversidade e complexidade dos polissacarídeos de algas vermelhas, evidenciando que esses compostos podem apresentar tamanhos muito distintos, dependendo da espécie estudada. Diversos fatores podem influenciar a massa molar do polissacarídeo, como a estrutura química, a quantidade de sulfatação e a composição das unidades monoméricas que formam o polímero. Os pesos moleculares dos polissacarídeos de algas vermelhas variam de dezenas a centenas de quilodaltons, dependendo de sua atividade biológica. Esses polímeros podem exibir atividades biológicas mais efetivas, tanto em baixo quanto em alto peso molecular, conforme mencionado por Pei et al. (2021).

Os efeitos biológicos dos PST-Aa em um modelo de Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA em ratos, utilizando cirurgia estereotáxica, revelaram efeitos neuroprotetores nos testes comportamentais e neuroquímicos. O campo aberto é o método mais empregado para analisar a atividade exploratória e as condições locomotoras dos animais (ALENCAR et al., 2022). Os resultados demonstraram que ambas as doses de PST, 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg, conseguiram aumentar o número de cruzamentos, sendo a dose de 0,3 mg/kg destacada como a mais efetiva nesse parâmetro, apresentando uma recuperação da locomoção dos animais em 32,13% quando comparada ao grupo 6-OHDA (6 μ L/ 21 μ g). Os polissacarídeos de algas vermelhas já têm demonstrado efeitos neuroprotetores quando avaliados em modelos comportamentais, especialmente no teste do campo aberto. Por exemplo, os polissacarídeos de *Gracilaria cornea* exibiram recuperação das condições exploratórias em animais tratados com as doses de 15 μ g e 60 μ g (SOUZA, 2015). Essas evidências reforçam o potencial terapêutico dos polissacarídeos de algas vermelhas, incluindo os PST-Aa, no tratamento de condições neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson. O campo aberto continua sendo uma ferramenta valiosa para avaliar os efeitos comportamentais desses compostos, fornecendo informações essenciais para avançar na compreensão de suas propriedades e aplicações na neurociência.

A atividade exploratória vertical, conhecida como *rearings*, é um parâmetro que fornece informações importantes sobre o estado dos animais dentro da arena, podendo ser representada de duas formas: quando o animal se inclina sobre as patas traseiras sem suporte e se apoia nas paredes do campo, e quando não apresenta suporte. Ambos os comportamentos de *rearings* revelam o estado de estresse do animal, já que a busca por conhecer e explorar o novo ambiente pode trazer consigo um alto ou baixo nível de estresse. Com isso, a criação sem suporte demonstra um estado estável do animal com baixo nível de ansiedade (STURMAN; GERMAIN; BOHACEK, 2018). Foi comprovado que as doses de PST-Aa de 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg aumentaram o número de atividades de *rearings* sem suporte na arena em 83,25% e 100,5%, respectivamente, quando comparadas ao grupo 6-OHDA (6 μ L/ 21 μ g), mostrando-se candidatas a efeitos ansiolíticos de acordo com as definições do teste comportamental.

A atividade de autolimpeza é um comportamento inato dos roedores e está ligado ao cuidado e proteção do corpo. No entanto, a ocorrência repetitiva desse comportamento pode ser desencadeada por fatores como exposição a estados de estresse, administração de drogas e fatores ambientais (ESTANISLAU, 2012). Nossos resultados demonstraram que os animais pertencentes ao grupo 6-OHDA (6 μ L/ 21 μ g) apresentaram um aumento significativo no

número de aliciamento, enquanto as doses de 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg promoveram uma redução em 57,3% e 53,4%, respectivamente. Esses resultados são semelhantes ao trabalho de Costa (2016), que também trabalhou com animais lesionados com 6-OHDA, os quais apresentaram aumento no número de grooming. A administração de compostos naturais, como foi comprovado no trabalho de Alencar et al. (2022), realizando um tratamento subcrônico em ratos, demonstrou que o aumento no número de grooming estava relacionado a distúrbios cerebrais.

A imobilidade dos animais relaciona-se aos tremores de repouso em pacientes portadores da doença de Parkinson, um sintoma motor desencadeado pelo déficit de dopamina. Observa-se com base nos resultados que as doses 0,3 mg/kg ($41,82 \pm 3,81$ s) e 3,0 mg/kg ($42,11 \pm 2,41$ s) reduziram significativamente o tempo de imobilidade dos animais quando comparado ao grupo 6-OHDA. Esses resultados estão de acordo com os de Souza, (2015) que comprovou que polissacarídeos de *Gracilaria cornea* reduziu o tempo de imobilidade em $18,1 \pm 3,9$ s na dose de 60 μ g.

A 6-OHDA quando injetada unilateralmente no estriado direito de animais, promove um déficit motor na atividade da pata contralateral a lesão. O teste do cilindro é importante pois comprova esse comportamento motor nos animais com parkinsonismo. O presente trabalho demonstrou que não houve diferenças significativa no total de toques contralaterais nos animais lesionados com a 6-OHDA (%contralateral: $34,78 \pm 3,02$ tempo executado) comparado com o grupo salina (%contralateral: $38,30 \pm 1,26$ tempo executado) e tratados com PST-Aa 0,3 mg/kg (% contralateral: $36,96 \pm 2,37$ tempo executado) e PST-Aa 3,0 mg/kg (% contralateral: $35,54 \pm 2,89$ tempo executado), enquanto que o número de toques de ambas as patas demonstrou que animais do grupo 6-OHDA possui deficiência nesse comportamento comparado aos animais controle negativo (% ambas: $14,91 \pm 2,00$ tempo executado) e tratados com PST-Aa 0,3 mg/kg (% ambas: $21,73 \pm 2,86$ tempo executado) e PST-Aa 3,0 mg/kg (% ambas: $32,34 \pm 2,47$ tempo executado). Observa-se que os animais tratados com polissacarídeos de *A. armata* submetidos a lesão unilateral conseguiu reverter os danos promovidos pela 6-OHDA, aumento o número de toques por ambas as patas como no grupo salina.

O óxido nítrico é um importante neuromodulador e possui ação na autoimunidade. No entanto, quando sua produção é excessiva, pode gerar danos às células neuronais. (TAYLOR; MAIN; CRACK, 2013). Nosso trabalho revelou que em todas as áreas cerebrais dos animais lesionados com a 6-OHDA houve um aumento na concentração de nitrito/nitrato

quando comparado com o grupo salina, esse resultado é semelhante ao trabalho de Toun et al., (2021) e isso pode ser explicado pelo fato da auto oxidação da 6-OHDA gerar espécies reativas como a geração de NO, e este gerar outros compostos reativos como o peroxinitrito, promovendo aumento de processo inflamatório e oxidativo os quais estão presente nas disfunções neurodegenerativas da DP.

Os polissacarídeos sulfatados na dose de 3,0 mg/kg na região do corpo estriado ipsilateral conseguiram reduzir consideravelmente a concentração de nitrito/nitrato quando comparados com o grupo lesionado por 6-OHDA. Os PSTs de *A. armata* possuem atividade anti-inflamatória já reportada na literatura. Com isso, as estruturas de carragenanas e agaranas, com seus constituintes sulfatados, atuam na mediação de respostas inflamatórias, ativando células de defesa e diminuindo a produção excessiva de moléculas oxidantes, a fim de manter a homeostase fisiológica (CUI et al., 2019). Para as demais regiões encefálicas, não foram observados valores significativos para os PST-Aa.

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo teste de TBARS, utilizando o malonildialdeído (MDA) como biomarcador desse processo. Nossos resultados demonstraram que em todas as regiões testadas houve aumento desse biomarcador nos animais lesionados com a 6-OHDA. No entanto, na região do hipocampo, os animais tratados com as doses de 0,3 mg/kg e 3,0 mg/kg apresentaram redução da peroxidação lipídica. Esses resultados são semelhantes aos de Souza et al. (2015), que demonstraram que os polissacarídeos de *Gracilaria cornea* promoveram diminuição na peroxidação lipídica quando comparados com o grupo lesionado com a neurotoxina. A 6-OHDA induz uma série de modificações a nível celular, gerando neurotoxicidade nas células mitocondriais, apoptose e peroxidação lipídica (FERAH OKKAY et al., 2021). A MDA é formada por três átomos de carbono com dois grupos aldeídos nas posições dos carbonos 1 e 3. Essa molécula orgânica mutagênica tem sido associada a diversas patologias, incluindo a doença de Parkinson (MORALES; MUNNÉ-BOSCH, 2019). Uma redução desse biomarcador pelas moléculas de polissacarídeos sulfatados de *A. armata* indica ação contra o estresse oxidativo e atividade antioxidante.

A atividade de glutathiona reduzida (GSH) foi avaliada e os resultados demonstraram uma redução na concentração de GSH nos animais lesionados com 6-OHDA, evidenciando que essa neurotoxina promove um desequilíbrio entre as moléculas oxidativas e as defesas antioxidantes. No entanto, foi possível comprovar que os polissacarídeos sulfatados de *A. armata*, nas doses de 0,3 mg/kg ($334,7 \pm 15,13$) e 3,0 mg/kg ($306,8 \pm 7,45$) na região do corpo estriado contralateral, apresentaram um aumento significativo na concentração de GSH. Um

estudo realizado por Souza et al. (2016) demonstrou que o polissacarídeo extraído da espécie *Solieria filiformis* promoveu um aumento significativo de GSH na mucosa gástrica de camundongos *Swiss*, comprovando sua propriedade antioxidante. Outro estudo demonstrou que polissacarídeos isolados da alga vermelha *Digenea simplex* apresentaram elevada concentração de GSH contra as moléculas oxidativas presentes na inflamação do intestino de ratos *Wistar* machos em modelo de colite (MONTURIL et al., 2020).

Dessa forma, os resultados desse estudo comprovam que os polissacarídeos de *A. armata*, administrados oralmente em ratos *Wistar*, auxiliaram na melhora dos sintomas parkinsonianos desencadeados pela administração da neurotoxina 6-OHDA. Os modelos comportamentais e neuroquímicos indicam que essas macromoléculas apresentam efeitos antioxidantes e neuroprotetores.

8 CONCLUSÃO

Os polissacarídeos sulfatados de *Asparagopsis armata* demonstraram possuir estruturas de galactana híbrida complexa constituída das unidades básicas 3- β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4)- α -D/L-galactopiranosose.

Neste estudo, demonstramos que os PST-Aa exibem um efeito neuroprotetor em modelo de doença de Parkinson em ratos induzidos por 6-OHDA. Além disso, foi demonstrado que os PST-Aa apresentam efeitos antinitrosativos e antioxidantes significativos na região encefálica de ratos. Esses resultados sugerem que os PST-Aa possuem um potencial terapêutico promissor no combate à neurodegeneração e ao estresse oxidativo.

No entanto, estudos adicionais são necessários para compreender completamente o mecanismo de ação dos PST-Aa e sua eficácia em diferentes modelos experimentais e condições clínicas. Os dados obtidos até o momento destacam a importância de investigar ainda mais esses compostos como potenciais neuroprotetores.

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D. et al. Cognitive decline in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, [s. l], v. 13, n. 4, p. 217-231, 3 mar. 2017.
- ADRIEN, A. et al. Anticoagulant activity of sulfated ulvan isolated from the green macroalga *Ulva rigida*. **Marine Drugs**, [s. l], v. 17, n. 5, p. 291, 14 maio 2019.
- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v. 97, n. 2, p. 253–261, 12 set. 2013.
- ALENCAR, M. V. O. B. et al. Oxidative stress mediated cytogenotoxicological effects of phytol in wistar albino rats. **Advances in Traditional Medicine**, [s. l], p. 1–18, 6 fev. 2022.
- ALTAMIRANO, M., MUÑOZ, A.R., DE LA ROSA, J., BARRAJÓN-MÍNGUEZ, A., BARRAJÓN-DOMENECH, A., MORENO-ROBLEDO, C., ARROYO, M.C., The invasive species *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) on Andalusian coasts (Southern Spain): reproductive stages, new records and invaded communities. **Acta Botanica Malacitana**, [s. l], v.33, p. 5-15, 2008.
- ALVES, C. et al. Algae from Portuguese Coast Presented High Cytotoxicity and Antiproliferative Effects on an in vitro Model of Human Colorectal Cancer. **Pharmacognosy Research**, [s. l], v. 10, n. 1, p. 24–30, 1 jan. 2018.
- AMORIM, S. et al. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l], v. 55, n. 2, p. 171–181, 2012.
- ANDRADE, RENATO MARTINS. **Carragenana de alga marinha vermelha Solieria Filiformis**: caracterização estrutural e avaliação da atividade cicatrizante. 2016. 80 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Fortaleza, 2016.
- ANDREAKIS, N.; PROCACCINI, G.; KOOISTRA, W. H. *Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations. **European Journal of Phycology**, [s. l], v. 39, n. 3, p. 273–283, ago. 2004.
- Archer, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, [s. l], 21(2), 564 205–235, 1973.
- AROKIARAJAN, M. S. et al. Advance research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l], v. 194, p. 870-881, 1 jan. 2022.
- ARREOLA, R. et al. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. **Journal of Immunology Research**, [s. l], v. 16, 2016.
- AZEVEDO, T.C.G. et al. Heparinoids algal and their anticoagulant hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l], v.63, n.7, p.477-483, 2009.
- AZIZ, E. et al. An overview on red algae bioactive compounds and their pharmaceutical applications. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, [s. l], v. 17, n. 4, p. 1 - 21, 1 dez. 2021.

BADANJAK, K. et al. The Contribution of Microglia to Neuroinflammation in Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular**, [s. l], vol. 22, p. 4676, v. 22, n. 9, p. 4676, 28 abr. 2021.

BAGHEL, R. S.; REDDY, C. R. K.; SINGH, R. P. Seaweed-based cellulose: Applications, and future perspectives. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v.267, p. 118241, 2021.

BARNHILL, L. M.; MURATA, H.; BRONSTEIN, J. M. Studying the Pathophysiology of Parkinson's Disease Using Zebrafish. **Biomedicines**, [s. l], v. 8, n. 7, p. 197, 7 jul. 2020.

BARROS, Francisco Clark Nogueira. **Caracterização estrutural e propriedades antitumorais dos polissacarídeos extraídos da alga vermelha *Gracilaria caudata* J. GARDN**. 2011. 138 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2011.

BATISTA, JALLES A.; et al. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v. 99, p. 59-67, 2014.

BECKERS, M.; BLOEM, B. R.; VERBEEK, M. M. Mechanisms of peripheral levodopa resistance in Parkinson's disease. **Npj Parkinson's Disease**, [s. l], v.8, n. 1, p. 1-9, 11 maio 2022.

BHATIA, A.; SAADABADI, A. **Biochemistry, Dopamine Receptors**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2019.

BJØRKLUND, G. et al. The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l], v. 120, p. 470–478, 1 jan. 2021.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l], v. 72, p. 248–254. 1976.

BIRIS-DORHOI, E. S. et al. Macroalgae—A sustainable source of chemical compounds with biological activities. **Nutrients**, [s. l], v. 12, n. 10, p. 1- 23, 2 out. 2020.

BOELEN KEUN, J. T. et al. Dietary Approaches to Improve Efficacy and Control Side Effects of Levodopa Therapy in Parkinson's Disease: A Systematic Review. **Advances in Nutrition**, [s. l], v. 12, n. 6, p. 2265–2287, 1 dez. 2021.

CAGGIU, E. et al. Inflammation, infectious triggers, and Parkinson's disease, **Frontiers in Neurology**, [s. l], v. 10, p. 1-9, 2019.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, [s. l], v. 1, p. 25-31, 1979.

CARMO, Marta Regina Santos. **Efeito neuroprotetor do antagonismo dos receptores p2x7 no parkinsonismo experimental induzido por 6-OHDA**. 2015. 110 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

CASTRO, J. P. L. et al. Polysaccharides of red alga *Gracilaria intermedia*: Structure, antioxidant activity and rheological behavior. **Polimeros**, [s. l], v. 28, n. 2, p. 178–186, 1 abr.

2018.

CIANCIA, M. NOSEDA, M.D. MATULEWICZ & A.S. CERESO, M. C. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v. 20, P. 95-98, 1993.

CIANCIA, M.; FERNÁNDEZ, P. V.; LELIAERT, F. Diversity of Sulfated Polysaccharides From Cell Walls of Coenocytic Green Algae and Their Structural Relationships in View of Green Algal Evolution. **Frontiers in Plant Science**, [s. l], v.11, p. 1452, 29 set. 2020.

CHAGAS, Francisco Diêgo da Silva. **Caracterização estrutural e propriedades bioativas dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Gelidiella acerosa**. 2018. 88f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CHAVES, Luciano de Sousa. **Polissacarídeos de Alga Marinha Gracilaria birdiae (Plastino e Oliveira): Estrutura e Avaliação Toxicológica**. 2008. 81 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2008.

CHOPIN et al. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Phycological Research**, [s. l], v. 47, p. 167-188, 1999

CHUALÁIN, F.N., MAGGS, C.A., SAUNDERS, G.W., GUIRY, M.D. The invasive genus *Asparagopsis* (Bonnemaisoniaceae, Rhodophyta): molecular systematics, morphology, and Ecophysiology of *Falkenbergia* isolates. **Journal of Phycology**, [s. l], 40: 1112-1126, 2004.

CHUPROSKI, Ana Paula. **Efeito Neuroprotetor da Suplementação com Ácidos Graxos Ômega-3 nas alterações não-motoras da Doença de Parkinson induzida pela 6-OHDA em ratos**. 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

COSTA, R. O. C. **Avaliação dos efeitos do exercício físico na lesão estriatal unilateral por 6-ohda em ratos**. 2016. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia**. 6. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 315 .p.

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

COURA et al. Mechanisms Involved in the Anti-Inflammatory Action of a Polysulfated Fraction from *Gracilaria cornea* in Rats. **PLOS ONE**, [s. l], v.10, p. 1-18, 2015.

CUNHA, J. M. SIQUEIRA, E. C. The role of neurosurgery in Parkinson's disease: literature

review, **Rev Med** (São Paulo), v. 1, p.66-75, 2020

DAMASCENO, MANARA BEZERRA BASBOSA COSTA. **Participação da neurotransmissão dopaminérgica no efeito hiperlocomotor do neuropeptídeo S.** 2014, 77 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

DEXTERA, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l], v. 62, p. 132-144, 1 set. 2013.

DI GIOVANNI, G. et al. Monoaminergic and histaminergic strategies and treatments in brain diseases. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l], v. 10, 2016.4

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, [s. l], v.70, n.2, p.645-647, 1976.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G.; A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. **Biochemistry Journal**, [s. l], v.84, p. 350-356, 1961.

DONZUSO, G. et al. Structural MRI substrate of long-duration response to levodopa in Parkinson's disease: an exploratory study. **Journal of Neurology**, [s. l], v. 268, n. 11, p. 4258–4264, 1 nov. 2021.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, [s. l], v. 186, p. 421-431, 1990.

EISENHOFER, G.; REICHMANN, H. Dopaminergic Neurotransmission. **Primer on the Autonomic Nervous System**, [s. l], p. 63–65, 1 jan. 2012.

ELLIS, J. M.; FELL, M. J. Current approaches to the treatment of Parkinson's Disease. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l], v. 27, n. 18, p. 4247-4255, 15 de set. 2017.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H.; WONG, H. Analysis of pyruvylated β -carrageenan by 2D NMR spectroscopy and reductive partial hydrolysis. **Carbohydrate Research**, [s. l], v. 338, n. 13, p. 1403–1414, 23 jun. 2003.

FARIAS, W. R. L. et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l], v. 275, n. 38, p. 29299–29307, 22 set. 2000.

FÉLIX, R. et al. The biotechnological potential of *Asparagopsis armata*: What is known of its chemical composition, bioactivities and current market?. **Algal Research**, [s. l], v. 60, p. 102534, 1 dez. 2021.

FENTON, A. R.; JONGENS, T. A.; HOLZBAUR, E. L. F. Mitochondrial dynamics: Shaping and remodeling an organelle network. **Current opinion in cell biology**, [s. l], v. 68, p. 28–36, 1 fev. 2021.

FERAH OKKAY, I. et al. Neuroprotective effect of bromelain in 6-hydroxydopamine induced in vitro model of Parkinson's disease. **Molecular Biology Reports**, [s. l], v. 48, n. 12, p. 7711–7717, 1 dez. 2021.

- FIDELIS, G. P. et al. 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, 13 nov. 2014.
- FLEURENCE, Joel; LEVINE, Ira. **Seaweed in Health and Disease Prevention**. 1^a ed. Academic Press; Londres, Reino Unido: 2016.
- GANESAN, A. R.; TIWARI, U.; RAJAURIA, G. Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. **Food Science and Human Wellness**, [s. l], v. 8, n.3, p. 252-263, 1 set. 2019.
- GAO, X. et al. A novel polysaccharide isolated from *Ulva Pertusa*: Structure and physicochemical property. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v. 233, p. 115849, 1 abr. 2020.
- GARON-LARDIERE, S. **Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge asparagopsis armata (bonnemaisoniales)**. 2004. 332 f. Tese (Ecole doctorale des sciences de la matière, de l'information et du vivant) - Université de bretagne occidentale, bretagne, 2004.
- GENOVESE, G., TEDONE, L., HAMANN, M.T., MORABITO, M. The Mediterranean Red Alga *Asparagopsis*: A Source of Compounds against *Leishmania*. **Marine Drugs**, [s. l], v.7, p.361-366, 2009.
- GREEN, L. C.; TANNEMBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, [s. l], v. 212, p. 56-58, 1981.
- GOLDMAN, J. G.; POSTUMA, R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, [s. l], v. 27, n. 4, p. 434-441, 2014.
- GOMES, F.J.(2021) **Efeitos do beta-cariofileno nas alterações comportamentais. Bioquímicas e na motilidade gastrointestinal de ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson induzida por 6-OHDA: avaliação do eixo cérebro-intestino**. 2021. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, 2021.
- GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). **Talanta**, [s. l], v. 93, p. 153–159, 15 maio 2012.
- GONÇALVES, V. C. et al. Heart Matters: Cardiac Dysfunction and Other Autonomic Changes in Parkinson's Disease. **Neuroscientist**, [s. l], p. 1–13, 15 fev. 2021.
- GONG, Y. et al. Structural characteristics and anti-inflammatory activity of UV/H₂O₂-treated algal sulfated polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l], v. 152, p. 112157, 1 jun. 2021.
- GUIRY, M. D. How many species of algae are there. **J. Phycol**, v. 48, p. 1057-1063, 2012.
- GÜRKAN POLAT, T.; DUMAN, O.; TUNÇ, S. Preparation and characterization of environmentally friendly agar/κ-carrageenan/montmorillonite nanocomposite hydrogels. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l], v. 602, p. 124987, 5 out. 2020.
- HANNAN, M. A. et al. Neuroprotective Potentials of Marine Algae and Their Bioactive

Metabolites: Pharmacological Insights and Therapeutic Advances. **Marine Drugs**, [s. 1], v.18, n. 7, p. 1-34, 1 jul. 2020.

HARLEY, C. D. G. et al. Effects Of Climate Change On Global Seaweed Communities. **Journal of Phycology**, [s. 1], v. 48, n. 5, p. 1064-1078, out. 2012.

HASLIN, C.; LAHAYE, M.; PELLEGRINI, M. Chemical composition and structure of sulphated water-soluble cell-wall polysaccharides from the gametic, carposporic and tetrasporic stages of *Asparagopsis armata* Harvey (Rhodophyta, Bonnemaisoniaceae), [s. 1], 43, n. 5, p. 475–482, 7 set. 2000.

HASLIN, C. et al. In Vitro Anti-HIV Activity of Sulfated Cell-Wall Polysaccharides from Gametic, Carposporic and Tetrasporic Stages of the Mediterranean Red Alga *Asparagopsis armata*. **Planta Medica**, [s. 1], v. 67, n. 4, p. 301–305, 31 dez. 2001.

HE, J. et al. Oxidative Stress and Neuroinflammation Potentiate Each Other to Promote Progression of Dopamine Neurodegeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. 1], v. 2020, p. 12, 2020.

HENTATI, F. et al. Bioactive polysaccharides from seaweeds. **Molecules**, v. 25, p. 3152, 9 jul. 2020.

HORTA, A. et al. Identification of *Asparagopsis armata*-associated bacteria and characterization of their bioactive potential. **MicrobiologyOpen**, [s. 1], v. 8, n. 11, 1 nov. 2019.

HUANG, C.; ZHANG, Z.; CUI, W. Marine-derived natural compounds for the treatment of Parkinson's disease. **Marine Drugs**, [s. 1], v. 17, n. 4, 2019.

ISMAIL, M. M.; AMER, M. S. Characterization and biological properties of sulfated polysaccharides of *Corallina officinalis* and *Pterocladia capillacea*. **Acta Botanica Brasilica**, [s. 1], v. 34, n. 4, p. 623–632, 25 jan. 2021.

JACINTO, M. S. D. C. Impact of the invasive macroalgae *Asparagopsis armata* - an ecotoxicological assessment. **Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos**, 88f, 2015.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine drugs**, [s. 1], v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

KHAN, B. M. et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of sulphated polysaccharides derived from *Porphyra haitanensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. 1], v. 145, p. 1155–1161, 15 fev. 2020.

KLNC, B. et al. Seaweeds for Food and Industrial Applications. In: **Food Industry**. [s.1.] InTech, p. 1–14, 2013.

KIM, Y. S.; JOO, W. S.; JIN, B. K.; CHO, Y. H.; BAIK, H. H.; PARK, C. W. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport**, [s. 1], v. 9, p. 2387-2390, 1998.

KO, W. K. D.; BEZARD, E. Experimental animal models of Parkinson's disease: A transition from assessing symptomatology to α -synuclein targeted disease modification. **Experimental Neurology**, [s. 1], v. 298, p. 172–179, 1 dez. 2017.

- KRAAN, S.; BARRINGTON, K. A. Commercial farming of *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniaceae, Rhodophyta) in Ireland, maintenance of an introduced species? **Journal of Applied Phycology**, [s. l], v. 17, n. 2, p. 103–110, mar. 2005.
- LAHAYE, M.; YAPHE, W.; ROCHAS, C. 13C-N.m.r.-spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type. **Carbohydrate Research**, [s. l], v. 143, n. C, p. 240–245, 1 nov. 1985.
- LAJILI, S. et al. Characterization of sulfated polysaccharide from *Laurencia obtusa* and its apoptotic, gastroprotective and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l], v. 126, p. 326–336, 1 abr. 2019.
- LI, N. et al. Advances in dietary polysaccharides as anticancer agents: Structure-activity relationship. **Trends in Food Science and Technology**, v. 111, p. 360-377, 1 maio 2021.
- LIAO, M. L. et al. Sulfated galactans from Australian specimens of the red alga *Phacelocarpus peperocarpus* (Gigartinales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, [s. l], v. 296, n. 1–4, p. 237–247, 24 dez. 1996.
- LIAO, Y. C. et al. Algae-derived hydrocolloids in foods: applications and health-related issues. **Bioengineered**, [s. l], v. 12, n. 1, p. 3787, 2021.
- MARCIA, S. et al. Galactan polysaccharides extraction from invasive algae *Asparagopsis armata* (Harvey) of the Peniche coast. **Frontiers in Marine Science**, [s. l], v. 1, 2014.
- MARIN, Eder Prodossimo. **Espectroscopia de infravermelho e suas aplicações**. 2013. 73 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2013.
- MATOS, J. A. **Filmes e revestimentos comestíveis a base do Polissacarídeo Sulfatado da alga vermelha (*Hypnea musciformis*) incorporados de ácido cafeico para aplicação em pescado**. 2020. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, 2020.
- METTWALLY, W. S. A. et al. Biological activities and structural characterization of sulfated polysaccharide extracted from a newly Mediterranean Sea record *Grateloupia gibbesii* Harvey. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l], v. 45, p. 102487, 1 out. 2022.
- MICHEL, G.; TONON, T.; SCORNET, D.; COCK, J. M.; KLOAREG, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. **New Phytol**, [s. l], v. 188, p. 82- 97, 2010.
- MILLER, I. J.; BLUNT, J. W. Mobility of sulfate ester during structural determinations of red algal galactans. **Botanica Marina**, [s. l], v. 45, n. 6, p. 559–565, 19 nov. 2002.
- MONTURIL, H. P. H. R. et al. Sulfated Polysaccharide from *Digenea simplex* Decreases Intestinal Inflammation in Rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l], v. 30, n. 3, p. 388–396, 1 jun. 2020.
- MORALES, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Malondialdehyde: Facts and artifacts. **Plant Physiology**, [s. l], v. 180, n. 3, p. 1246, 1 jul. 2019.
- MOURÃO, A.P.S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future

- perspectives. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l], v.10, n.9, p.967-981, 2004.
- Necas, J. Bartosikova, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, [s. l], 58, (4): 187–205, 2013.
- NUNES, C.; LARANJINHA, J. Nitric oxide and dopamine metabolism converge via mitochondrial dysfunction in the mechanisms of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l], v. 704, p. 108877, 15 jun. 2021.
- OLASEHINDE, T. A.; OLANIRAN, A. O.; OKOH, A. I. Sulfated polysaccharides of some seaweeds exhibit neuroprotection via mitigation of oxidative stress, cholinergic dysfunction and inhibition of Zn – induced neuronal damage in HT-22 cells. **BMC Complementary Medicine and Therapies 2020 20:1**, [s. l], v. 20, n. 1, p. 1–10, 14 ago. 2020.
- PACIOS, I., GUERRA-GARCÍA, J.M., BAEZA-ROJANO, E., CABEZAS, M.P. The non-native seaweed *Asparagopsis armata* supports a diverse crustacean assemblage. **Marine Environmental Research**, [s. l], v. 71, p.275-282, 2011.
- PAL, A.; KAMTHANIA, M. C.; KUMAR, A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds—A Review. **OALib**, [s. l], v. 01, n. 04, p. 1–17, 1 jul. 2014.
- PANDEY, P.; MERSHA, M. D e DHILLON, H. S. A Synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interaction. **Journal of molecular signaling**, [s. l], v. 8, n. 1, p. 13, 2013.
- PANDEY, S. SRIVANITCHAPOOM, P. Discinesia induzida por levodopa: características clínicas, fisiopatologia e tratamento médico. **Ann Indian Acad Neurol**. [s. l], v.20, n. 3, p. 190 – 8, 2017.
- PANDEY, M. K. et al. Bioprospecting microalgae from natural algal bloom for sustainable biomass and biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l], v. 103, n. 13, p. 5447–5458, 4 jul. 2019.
- PARRA-PAZ, V. G. et al. Chronic feeding with 3% dried raw blueberries (*V. corymbosum*) reduces apomorphine-induced rotations and striatal dopaminergic loss in hemiparkinsonian rats. **Food Research International**, [s. l], v. 140, p. 110066, 1 fev. 2021.
- PAYAMI, H. The emerging science of precision medicine and pharmacogenomics for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, [s. l], v. 32, n. 8, p. 1139–1146, 1 ago. 2017.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York: Academic Press**, [s. l], 1986.
- PRADHAN, B.; KI, J. S. Biological activity of algal derived carrageenan: A comprehensive review in light of human health and disease. [s. l], 238, p. 124085, 31 maio 2023.
- PEI, Y. et al. Structural Characterization of Sulfated Polysaccharide Isolated From Red Algae (*Gelidium crinale*) and Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in Macrophage Cells. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l], v. 9, 18 nov. 2021.
- PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**, [s. l], New York: Academic Press, 1967. 219 p.

PEREIRA, M.G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, [s. l], v.340, n.12, p.2015-2023, 2005.

PEREIRA JÚNIOR, Lindauro da Costa. **Caracterização estrutural químico, propriedades reológicas e efeito antioxidante do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Acanthophora spicifera***. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

PEREIRA, T. et al. Optimization of phycobiliprotein pigments extraction from red algae *Gracilaria gracilis* for substitution of synthetic food colorants. **Food Chemistry**, [s. l], v. 321, p. 126688, 15 ago. 2020.

PEREIRA, L.; VALADO, A. The Seaweed Diet in Prevention and Treatment of the Neurodegenerative Diseases. **Marine Drugs**, [s. l], v. 19, n. 3, p. 128, 26 fev. 2021.

PICCA, A. et al. Mitochondrial Dysfunction, Protein Misfolding and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: Roads to Biomarker Discovery. **Biomolecules**, [s. l], v. 11, n. 10, 1 out. 2021.

PINTO et al. Perfil epidemiológico de pacientes com doença de Parkinson em Belém do Pará. **Research, Society and Development**, [s. l], v. 11, n. 6, e20411628851, 2022

POMIN, V. H. NMR chemical shifts in structural biology of glycosaminoglycans. **Analytical Chemistry**, [s. l], v. 86, n. 1, p. 65–94, 7 jan. 2014.

PUJOL et al. Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue vírus. **International Medical Press**, [s. l], v. 13, p. 83-89, 2002

RAY, B. et al. “Janus-Faced” α -Synuclein: Role in Parkinson's Disease. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l], v. 9, p. 1-29, 28 maio 2021.

REQUEJO, C. et al. Changes in Day/Night Activity in the 6-OHDA-Induced Experimental Model of Parkinson's Disease: Exploring Prodromal Biomarkers. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l], v. 14, p. 1101, 14 out. 2020.

RIBEIRO, C. V. P. E. **Estrutura e atividade antidiarreica de polissacarídeos da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* s. g. gmelin**. 2016. 80f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016

RODRIGUES, O. et al. 51 Prevalência do *Helicobacter pylori* em adolescentes submetidos à esofagogastroduodenoscopia, **VITALLE**, [s. l], v. 21, n. 1, p. 51-58, 2009.

RODRIGUES et al. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, mfracionamento e atividade anticoagulante. **Maringá**, [s. l], v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010

RODRIGUES et al., 2017. In vitro inhibition of thrombin generation by sulfated polysaccharides from the tropical red seaweed *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, [s. l], v. 5, n. 1, p. 22-32, 2017

ROQUE, B. M. et al. Inclusion of *Asparagopsis armata* in lactating dairy cows' diet reduces enteric methane emission by over 50 percent. **Journal of Cleaner Production**, [s. l], v. 234, p. 132–138, 10 out. 2019.

ROUAUD, T. et al. Pathophysiology of Parkinson's disease: Mitochondria, alpha-synuclein and much more.... **Revue Neurologique**, [s. l], v. 177, n. 3, p. 260–271, 1 mar. 2021.

SALEHI, B. et al. Current trends on seaweeds: Looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. **Molecules**, [s. l], v. 24, n. 22, p. 4182, 18 nov. 2019.

SALURI, M. et al. Structural variability and rheological properties of furcellaran. **Food Hydrocolloids**, [s. l], v. 111, p. 106227, 1 fev. 2021.

SANJEEWA, K. K. A. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of high molecular weight sulfated polysaccharide; containing fucose separated from *Sargassum horneri*: Short communication. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l], v. 107, n. PartA, p. 803–807, 1 fev. 2018.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S. M; LEASURE, J. L.; TILLERSON, J. L.; BLAND, S.T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, [s. l], 39:777–87. 2000.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease, **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l], v. 18, n. 7, p. 435–450, 1 jul. 2017.

SHANURA FERNANDO, I. P. et al. FTIR characterization and antioxidant activity of water soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. **Algae**, [s. l], v. 32, n. 1, p. 75–86, 15 mar. 2017.

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, n. 1, p. 192–205, 1988.

SELMİ, A. et al. Analysis of Minerals and Heavy Metals Using ICP-OES and FTIR Techniques in Two Red Seaweeds (*Gymnogongrus griffithsiae* and *Asparagopsis taxiformis*) from Tunisia. **Biological Trace Element Research**, [s. l], v. 199, n. 6, p. 2342–2350, 1 jun. 2021.

SHANURA FERNANDO, I. P. et al. FTIR characterization and antioxidant activity of water soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. **Algae**, [s. l], v. 32, n. 1, p. 75–86, 15 mar. 2017.

SIELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol**, [s. l], v. 21, p. 227–236, 1946.

SILVA, J. et al. Antioxidant and Neuroprotective Potential of the Brown Seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an in vitro Parkinson's Disease Model. **Marine Drugs**, [s. l], v. 17, n. 2, p. 1–16, 1 fev. 2019.

SILVA, C. O. et al. *Asparagopsis armata* Exudate Cocktail: The Quest for the Mechanisms of Toxic Action of an Invasive Seaweed on Marine Invertebrates. **Biology**, [s. l], v. 10, n. 3, p. 223, 14 mar. 2021.

SOKOLOVA, E. V. et al. Effect of red seaweed sulfated galactans on initial steps of complement activation in vitro. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v. 254, p. 117251, 15 fev. 2021.

STANDAERT, D. E.; GALANTER, J. M. **Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica**. Cap. 12, 2014.

SONG, Y.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J. Analysis of the Glycosaminoglycan Chains of Proteoglycans. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [s. l], v. 69, n. 2, p. 121-135, 1 fev. 2021.

SOUZA, L. A. R. D. et al. Galactans from the red seaweed *Amansia multifida* and their effects on inflammation, angiogenesis, coagulation and cell viability. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, [s. l], v. 2, n. 3, p. 154–162, 1 jul. 2012.

SOUZA, Ricardo Basto. **Alga marinha vermelha *Gracilaria córnea*: Perspectivas biotecnológicas e implicações neurofarmacológicas**. 2015. 262 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SOUZA, W. M. et al. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v. 152, p. 140–148, 5 nov. 2016.

SOUZA, R. B. et al. Neuroprotective Effects of Sulphated Agar from Marine Alga *Gracilaria cornea* in Rat 6-Hydroxydopamine Parkinson's Disease Model: Behavioural, Neurochemical and Transcriptional Alterations. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, [s. l], v. 120, n. 2, p. 159–170, 1 fev. 2017.

SOUZA, R. B. et al. In vitro activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l], v. 112, p. 1248–1256, 1 jun. 2018.

SPRENGER, F.; POEWE, W. Management of motor and non-motor symptoms in parkinson's disease. **CNS Drugs**, [s. l], v. 27, n. 4, p. 259-272, 21 abr. 2013.

SRIVASTAVA, S.; AGRAWAL, S. B.; MONDAL, M. K. A review on progress of heavy metal removal using adsorbents of microbial and plant origin. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l], v. 22, n. 20, p. 15386–15415, 1 out. 2015.

STEPHANIE, B. et al. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v. 81, n. 2, p. 448–460, 11 jun. 2010.

STURMAN, O.; GERMAIN, P. L.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, [s. l], v. 21, n. 5, p. 443–452, 3 set. 2018.

SUMAYYA, S.; MURUGAN, K. Phytochemical screening, RP-HPLC and FTIR analysis of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty EX P.C Silva: Macro red algae. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, [s. l], v. 6, n. 1, p. 325–330, 2017.

SZASZ, J. A. et al. Characterizing Advanced Parkinson's Disease: Romanian Subanalysis from the OBSERVE-PD Study. **Parkinson's Disease**, [s. l], v. 2021, p. 1–12, 2021.

TAKANO, R. et al. Occurrence of carrageenan structure in an agar from the red seaweed *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales) with a short review of carrageenan-agarocolloid hybrid in the Florideophycidae. **Botanica Marina**, [s. l], v. 46, n. 2, p. 142–150, 10 mar. 2003.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-

conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, [s. l], v. 62, n. 5, p. 803–819, 1 abr. 2013.

TEIL, M. et al. Targeting α -synuclein for PD therapeutics: A pursuit on all fronts. **Biomolecules**, [s. l], v. 10, n. 3, p. 1-54, 1 mar. 2020.

TUON, T. et al. Behavior and oxidative stress parameters in rats subjected to the animal's models induced by chronic mild stress and 6-hydroxydopamine. **Behavioural Brain Research**, [s. l], v. 406, 21 maio 2021.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, [s. l], v. 12, n. 3, p. 301–308, 1 jul. 1998.

USOV, A. I. Polysaccharides of the red algae. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, [s. l], v. 65, p. 115-217, 2011

VANDERLEI, E. et al. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, [s. l], v. 60, n. 12, p. 1121–1130, dez. 2011.

VAVILALA, S. L, SOUZA, J. S. “Algal Polysaccharides and their biological applications,” in *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. Eds. Kim SK, Chojnacka K. (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons;), 2015.

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V. DE; SANTANA, L. DE A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde** -[s. l], p. 27, 6 set. 2015.

WANG, T. et al. Neuroinflammation in Parkinson's Disease: Triggers, Mechanisms, and Immunotherapies. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, [s. l], p. 1-18, 12 fev. 2021.

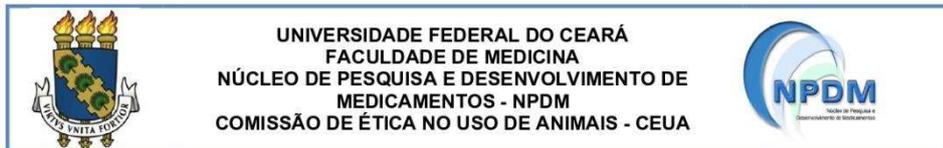
WASSIE, T. et al. Extraction Techniques, Biological Activities and Health Benefits of Marine Algae *Enteromorpha prolifera* Polysaccharide. **Frontiers in Nutrition**, [s. l], v. 8, p. 747, 7 out. 2021

WEINTRAUB, D. et al. Neuropsychiatric symptoms and cognitive abilities over the initial quinquennium of Parkinson disease. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, [s. l], v. 7, n. 4, p. 449–461, 1 abr. 2020.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, [s. l], v. 84, n. 1, p. 14-21, 11 fev. 2011.

ZANOLLA, M. et al. Morphological differentiation of cryptic lineages within the invasive genus *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta). **Phycologia**, [s. l], v. 53, n. 3, p. 233–242, 2014.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFC-NPDM



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"EFEITO NEUROPROTETOR DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA *Asparagopsis armata* EM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS"** registrada com o protocolo **20041021-0**, sob a responsabilidade de **Norma Maria Barros Benevides e Talita de Souza de Alcântara Lima**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de 21 / 10 / 2021.

We hereby certify that the project entitled **"NEUROPROTECTIVE EFFECT OF SULFATE POLYSACCHARIDES FROM MARINE ALGA *Asparagopsis armata* IN RATS PARKINSON'S DISEASE MODEL"** identified by the protocol number **20041021-0**, and conducted by **Norma Maria Barros Benevides and Talita de Souza de Alcântara Lima**, which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of 10 / 21 / 2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: NOVEMBRO/2021 Fim: NOVEMBRO/2025
Espécie	Rato heterogênico
Linhagem	Wistar
Nº de animais autorizados	368
Peso	250 a 290g
Idade	6 a 9 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Fortaleza, Ceará, 05 de novembro de 2021


 Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
 Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
 Universidade Federal do Ceará