



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

JOANA PAULA LIMA DE CASTRO

FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DA ALGA VERMELHA
GRACILARIA INTERMEDIA: UM ESTUDO QUÍMICO ESTRUTURAL, AVALIAÇÃO
DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA.

FORTALEZA-CE

2014

JOANA PAULA LIMA DE CASTRO

FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DA ALGA VERMELHA
GRACILARIA INTERMEDIA: UM ESTUDO QUÍMICO ESTRUTURAL, AVALIAÇÃO
DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

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

FORTALEZA-CE

2014

JOANA PAULA LIMA DE CASTRO

Frações polissacarídicas obtidas a partir da alga vermelha *Gracilaria intermedia*: um estudo químico estrutural, avaliação de atividade antioxidante e caracterização reológica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.


Aprovada em: 26/02/2014 .

BANCA EXAMINADORA



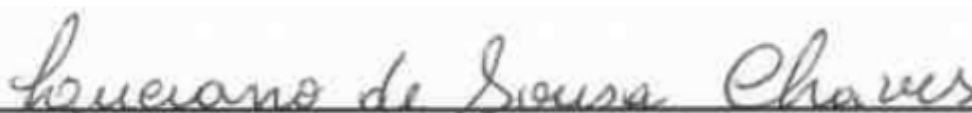
Dr.^a Ana Lucia Ponte Freitas (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará- UFC



Dra. Solange Pinheiro de Oliveira

Universidade Estadual do Ceará - UECE



Dr. Luciano de Sousa Chaves

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

C351f

Castro, Joana Paula Lima de.

Frações polissacarídicas obtidas a partir da alga vermelha *Gracilaria Intermedia*: um estudo químico estrutural, avaliação de atividade antioxidante e caracterização reológica. – 2014.

86 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Bioquímica de Macromoléculas - Glicídios.

Orientação: Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. Alga marinha. 2. Carboidratos. 3. Reologia. I. Título.

CDD 574.192

AGRADECIMENTOS

À **Prof.^a Ana Lúcia Ponte Freitas** por ter me acolhido, ter confiado em mim e por ter proporcionado uma convivência repleta de atenção, gentileza, respeito e companheirismo ao longo dos dois anos nos quais convivemos.

Ao **Prof. Nilo Cardozo** por sua receptividade, paciência, delicadeza, atenção, orientação, por todas as conversas, por todas as provas e por todas as horas.

A minha querida amiga e iniciação científica **Maísa Pinheiro** por toda a ajuda nos experimentos, pela preciosa companhia e por escutar todos os meus devaneios.

A **Noé Fonseca** e a **Pedro Hermano** pelo incentivo, companheirismo, indicações e auxílio em experimentos e análises.

Aos grandes e inesquecíveis companheiros de laboratório e de jornada cujas companhias e lembranças serão sempre mais preciosas que quaisquer títulos: Renalison Farias, Jaci Ximenes, Luciano Chaves, Victor Hugo, Juliana Pereira, Luís Eduardo, Antônio Viana, Renata Rivanor, Felipe Sousa, Iara Flávia, Aline Sousa, Aline Cipriano, Gyedre Araújo, Juliane Lira, Eliane Silva, Willer Malta e Poliana Cavalcante.

Ao CENAUREM pela disponibilização de equipamentos e a **Thiago dos Santos** pelas ajudas nas análises de RMN.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

“Não é o cérebro o que mais importa, mas sim o que o orienta: o caráter, o coração, a generosidade e as ideias progressistas.” (Fiodór Dostoievsky)

“... mas as coisas findas, muito mais que lindas, essas ficarão.” (Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

Algas marinhas do gênero *Gracilaria* são importantes fontes de ágar, polissacarídeos sulfatados que são comumente usados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e biotecnológica. Para caracterização do material de trabalho, a alga marinha foi submetida à análise de sua composição centesimal, a qual indicou seus percentuais de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos totais. Para avaliação dos polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria intermedia* foram obtidas frações pelas seguintes metodologias de extração: 1. extração por meio de digestão enzimática, 2. extração nativa (a alga não é submetida à pré-tratamentos e a obtenção dos polissacarídeos ocorre pela sua fervura) e 3. extrações nas quais a alga é pré-tratada com NaOH e KOH nas concentrações de 1% e 5%. Os materiais extraídos foram submetidos a testes colorimétricos de composição química (determinação do teor de proteínas e quantificação de carboidratos, sulfato e 3,6 anidrogactose). Os materiais foram ainda analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Foram realizados testes de atividade antioxidante com cada uma das frações obtidas. Os testes antioxidantes realizados (capacidade antioxidante total e quelação do íon ferroso) indicaram que tais polissacarídeos possuem capacidade de sequestrar radicais livres de maneira significativa e dose-dependente. Devido a estes resultados, os polissacarídeos obtidos a partir da alga marinha *Gracilaria intermedia* mostram potencial de virem a ser utilizados como um composto antioxidante não sintético. Experimentos para avaliar o comportamento reológico de soluções aquosas dos polissacarídeos em estudo foram realizados a 25 ± 1 °C, usando medidas estacionárias e dinâmicas oscilatórias, que indicaram que os materiais obtidos devem ser classificados como pseudoplásticos e apontaram as habilidades de tais soluções poliméricas em atuar como agentes espessantes e gelificantes.

Palavras-chave: *Gracilaria intermedia*, polissacarídeos, estrutura, atividade antioxidante, comportamento reológico.

ABSTRACT

The seaweed *Gracilaria* are important sources of agar sulfated polysaccharides that are commonly used in the food, pharmaceutical and biotechnology industries. For characterization of the media, the kelp was subjected to analysis of their chemical composition, which indicated their percentages of moisture, ash, protein and lipids. Extractions in which extraction by enzymatic digestion native extract (a seaweed is not subjected to pretreatments and obtaining the polysaccharides is by their boiling) is: For evaluation of red seaweed polysaccharides *Gracilaria intermedia* fractions were obtained for the following extraction methods seaweed is pretreated with NaOH and KOH in concentrations of 1% and 5%. The extracted material was subjected to colorimetric test chemical composition (protein content determination and quantification of carbohydrates, sulfate and 3,6-anhydro-galactose). The material was further analyzed by infrared spectroscopy with Fourier transform and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Antioxidant activity with each of the fractions obtained tests were performed. Antioxidants tests (total antioxidant capacity, chelation of ferrous ion) indicated that such polysaccharides have the ability to scavenge free radicals and significant dose-dependent manner. Due to these results, the polysaccharide obtained from seaweed *Gracilaria* show potential intermediate that they will not be used as a synthetic antioxidant compound. Experiments to evaluate the rheological behavior of aqueous solutions of polysaccharides under study were performed at 25 ± 1 °C, using stationary and dynamic oscillatory measurements, which indicated that the material obtained should be classified as pseudoplastic and highlighted the skills of such polymer solutions in acting as thickeners and gelling agents.

Keywords: *Gracilaria intermedia*, polysaccharides, structure, antioxidant activity , rheological behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Estrutura química da agarose e da agarpectina.....	21
Figura 02. Classificação do comportamento reológico dos fluidos.....	25
Figura 03. Curva de escoamento de fluidos não-newtonianos dependentes do tempo e de cisalhamento.....	26
Figura 04. Curva de escoamento de fluidos não-newtonianos independentes do tempo e de cisalhamento	27
Figura 05. Espectro mecânico de solução diluída, solução concentrada, gel forte e gel fraco.....	29
Figura 06. Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha <i>Gracilaria intermedia</i> e sua classificação taxonômica.....	31
Figura 07. Esquema de extração enzimática de polissacarídeos da alga vermelha <i>Gracilaria intermedia</i>	35
Figura 08. Esquema de extração de polissacarídeos sem a utilização de pré-tratamentos	36
Figura 09. Esquema de extrações que tiveram a alga pré-tratada com soluções alcalinas, a frio	37
Figura 10. Esquema de extrações que tiveram a alga pré-tratada com soluções alcalinas, a quente.....	38
Figura 11. Sistema cone-prato.....	44
Figura 12. Curva padrão para a estimativa da concentração de proteínas.....	48

Figura 13. Curva padrão que utilizou galactose para aplicação do método de Dubois.....	49
Figura 14. Determinação de Galactose pelo método Fenol-sulfúrico, com galactose como padrão, das amostras em estudo	50
Figura 15. Curva padrão utilizando frutose para a determinação colorimétrica do teor de 3,6 anidrogactose das amostras em estudo	51
Figura 16. Percentual de 3,6 anidrogactose quantificado nos produtos dos diferentes protocolos de extração de polissacarídeos da alga vermelha <i>Gracilaria intermedia</i>	52
Figura 17. Curva padrão confeccionada com sulfato de sódio anidro para quantificação de sulfato das amostras em estudo	53
Figura 18. Ilustração do percentual de sulfato livre presente nas frações polissacarídicas obtidas a partir da alga vermelha <i>Gracilaria intermedia</i> por meio de diferentes protocolos de extração.....	54
Figura 19. Espectros FT-IV em pastilhas de KBr dos Polissacarídeos de <i>Gracilaria intermedia</i> na região de número de onda de 1400 – 700 cm ⁻¹	56
Figura 20. Espectro de RMN de polissacarídeos extraídos de forma enzimática da alga vermelha <i>Gracilaria intermedia</i> em solução de D ₂ O. (A) ¹ H RMN (B) ¹³ C RMN.....	60
Figura 21. Espectro de COSY de Polissacarídeos de <i>Gracilaria intermedia</i> (extração enzimática) em D ₂ O.....	62
Figura 22. Capacidade antioxidante total de frações polissacarídicas de <i>Gracilaria intermedia</i>	63

Figura 23. Percentual de quelação do íon ferroso apresentada pelos polissacarídeos de <i>Gracilaria intermedia</i> e atividade exibida por ácido ascórbico.....	64
Figura 24. Gráficos que relacionam taxa de cisalhamento vs. taxa de deformação das amostras em estudo.....	65
Figura 25. Variação da viscosidade conforme taxa de deformação aplicada a soluções de polissacarídicas de <i>Gracilaria intermedia</i> em diferentes concentrações.....	69
Figura 26. Testes de varredura de frequência da amostra Enzimática nas concentrações 10,0 mg.mL ⁻¹ , 12,5 mg.mL ⁻¹ e 15,00 mg.mL ⁻¹	73
Figura 27. Testes de varredura de frequência da amostra Nativa nas concentrações 10,0 mg.mL ⁻¹ , 12,5 mg.mL ⁻¹ e 15,00 mg.mL ⁻¹	73
Figura 28. Testes de varredura de frequência da amostra NaOH 1% nas concentrações 10,0 mg.mL ⁻¹ , 12,5 mg.mL ⁻¹ e 15,00 mg.mL ⁻¹	74
Figura 29. Testes de varredura de frequência da amostra NaOH 5% nas concentrações 10,0 mg.mL ⁻¹ , 12,5 mg.mL ⁻¹ e 15,00 mg.mL ⁻¹	74
Figura 30. Testes de varredura de frequência da amostra KOH 1% nas concentrações 10,0 mg.mL ⁻¹ , 12,5 mg.mL ⁻¹ e 15,00 mg.mL ⁻¹	75
Figura 31. Testes de varredura de frequência da amostra KOH 5% nas concentrações 10,0 mg.mL ⁻¹ , 12,5 mg.mL ⁻¹ e 15,00 mg.mL ⁻¹	75
Figura 32. Testes de varredura de frequência da amostra Comercial nas concentrações 10,0 mg.mL ⁻¹ , 12,5 mg.mL ⁻¹ e 15,00 mg.mL ⁻¹	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 01.	Composição centesimal de algas marinhas.....	45
Tabela 02.	Rendimento de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas do gênero <i>Gracilaria</i>	47
Tabela 03.	Quantidade de 3,6 anidrogalactose encontrada em algas marinhas do gênero <i>Gracilaria</i>	52
Tabela 04.	Percentual de sulfato em espécies de algas do gênero <i>Gracilaria</i>	55
Tabela 05.	Atribuições aos picos obtidos em experimentos de infravermelho....	59
Tabela 06.	Atribuições aos sinais obtidos em experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.....	61
Tabela 07.	Áreas de histerese obtidas a partir dos gráficos de Taxa de Cisalhamento x Taxa de Deformação das amostras em estudo.....	68
Tabela 08.	Índice de lei da potencia apresentado por cada amostra, nas diferentes concentrações avaliadas.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHA	Butilato de Hidroxianisol
BHT	Butilato Hidroxitolueno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
G'	Módulo de Armazenamento
G''	Módulo de Dissipação
POX	Peroxidase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RVL	Região Viscoelástica Linear
SOD	Superóxido Desmutase
TBHQ	Terc-Butil-hidroquinona
ω	Frequência

SUMÁRIO

Resumo	07
Abstract.....	08
Lista de Figuras	09
Lista de Tabelas.....	12
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Carboidratos e Polissacarídeos.....	17
1.2 Algas	18
1.3 Ágar.....	21
1.4 Radicais livres e antioxidantes	22
1.5 Qualidade do ágar e reologia	23
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS.....	31
3.1 Coleta e identificação da alga marinha	31
3.2 Soluções e reagentes.....	31
4. MÉTODOS.....	33
4.1 Composição centesimal	33
4.1.1 Umidade	33

4.1.2 Cinzas.....	33
4.1.3 Proteína Bruta.....	33
4.1.4 Lipídios	34
4.1.5 Carboidratos Totais.....	34
4.2 Extração de polissacarídeos	34
4.2.1 Extração por digestão com papaína (Enzimática)	34
4.2.2 Extração sem pré-tratamento (Nativa).....	36
4.2.3 Extração de polissacarídeos com o pré-tratamento, a frio, da alga <i>Gracilaria intermedia</i>	37
4.2.4 Extração de polissacarídeos com o pré-tratamento, a quente, da alga <i>Gracilaria intermedia</i>	38
4.3 Rendimento	39
4.4 Caracterização de composição química	39
4.4.1 Determinação de proteínas.....	39
4.4.2 Determinação de carboidratos totais	40
4.4.3 Quantificação de 3,6 anidrogactose.....	40
4.4.4 Determinação de sulfato.....	41
4.5 Caracterizações da amostra por métodos espectroscópicos	42
4.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....	42
4.5.2 Ressonância Magnética Nuclear	42
4.6 Atividade antioxidante	42
4.6.1 Capacidade antioxidante total.....	42

4.6.2 Quelação do íon ferroso	43
4.7 Caracterização Reológica	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Análise da composição centesimal	45
5.2 Rendimentos	46
5.3 Determinação de proteínas	48
5.4 Determinação de carboidratos totais	48
5.5 Quantificação de 3,6 anidrogactose	50
5.6 Determinação de sulfato.....	53
5.7 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	55
5.8 Ressonância Magnética Nuclear.....	59
5.9 Atividade antioxidante	62
5.10 Comportamento Reológico.....	65
6. CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carboidratos e Polissacarídeos

Os carboidratos podem ser considerados como as biomoléculas mais abundantes da Terra; sendo a fotossíntese a grande responsável por sua taxa de renovação, já que tal processo atua convertendo, anualmente, cerca de 100 bilhões de toneladas métricas de CO₂ e H₂O em celulose e outros carboidratos (NELSON; COX, 2010).

Os carboidratos possuem diversos grupos funcionais, desempenhando diversas atividades. Carboidratos atuam como armazenadores de energia química, elementos estruturais em vegetais, componentes de gorduras e ácidos nucleicos. (VOLLHARDT; SHORE, 2006)

De acordo com Nelson; Cox (2010), os carboidratos são definidos como poli-hidroxi-aldeídos ou poli-hidroxi-cetonas, ou substâncias que geram estes compostos quando hidrolisadas. Muitos carboidratos têm a fórmula empírica (CH₂O)_n; alguns também contêm nitrogênio, fósforo ou enxofre. Os carboidratos são divididos em três classes: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (NELSON; COX, 2010).

Os monossacarídeos são ditos açúcares simples, sendo um aldeído ou uma cetona com, no mínimo, dois grupos hidróxi na molécula. Os oligossacarídeos são cadeias curtas de monossacarídeos ligados entre si por uma ponte éter (VOLLHARDT; SHORE, 2006). Os polissacarídeos são polímeros que contêm, ao menos, 20 unidades de monossacarídeos, sejam eles iguais ou diferentes; tais polímeros podem ser de cadeias lineares ou ramificadas, sendo os tipos de ligação determinantes para suas propriedades e funções biológicas (NELSON; COX, 2010).

São fontes usuais de polissacarídeos: os exsudatos de plantas (goma arábica e tragacante); as sementes (guar e alfarroba); os tubérculos e cereais (amido e inulina); os animais (ácido hialurônico, heparina, quitina e quitosana); os fungos (glucanas); as bactérias (xantana, dextrana e gelana); as frutas (pectina) e as algas (alginato, carragenanas e agaranas) (DA CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

1.2 Algas

As algas são organismos eucarióticos que não possuem características que os permitam ser classificados como elementos dos reinos Plantae, Fungi ou Animalia. Sendo, dessa forma, incluídas no reino Protista. Embora esta seja a classificação mais bem aceita na atualidade, muitas divergências ainda ocorrem entre os evolucionistas, uma vez que as relações filogenéticas entre os indivíduos incluídos em tal grupo estão distantes de uma clara elucidação (RAVEN; EVERT; EICHHORN 2007).

Raven; Evert e Eichhorn (2007) classificam como assombrosa a variedade de tipos estruturais observados nos indivíduos classificados como protistas. Dentre estas estão incluídas células ameboides; células solitárias que podem ou não possuir flagelos; colônias compostas por agrupamentos de células que podem ser flageladas (com um ou mais flagelos) ou não; filamentos ramificados ou não ramificados; lâminas com uma ou duas células de espessura; tecidos que se assemelham a alguns dos presentes em plantas ou animais e massas multinucleadas de protoplasma com ou sem parede celular.

As variações observadas no grupo Protista não estão restritas às células e sua organização em tecidos. Há ainda consideráveis variações de tamanho habitat e mecanismos de obtenção de energia. O tamanho dos protistas varia de microscópico a indivíduos com mais de 30 m de comprimento. Os protistas podem habitar ambientes marinhos, dulcícolas ou terrestres e obtêm energia de maneira autotrófica ou organotrófica.

As algas podem ser classificadas como microalgas ou macroalgas. A maioria delas está subdividida entre os filos Phaeophyta (algas pardas), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes). As algas pardas possuem cerca de 1.500 representantes, os quais, em sua maioria, estão presentes nas regiões de águas marinhas geladas; estas algas apresentam tamanhos que variam entre 30 cm e 20 m de comprimento. As algas vermelhas são entre 4.000 e 6.000 espécies; elas ocorrem em águas marinhas sejam elas frias temperadas ou tropicais. As algas vermelhas têm tamanhos variando de poucos centímetros até cerca de 1 m de comprimento e, apesar de serem ditas vermelhas, podem apresentar-se em tonalidades vermelho acastanhadas ou mesmo roxas. O grupo das algas verdes

possui cerca de 17.000 representantes, com tamanhos semelhantes às algas vermelhas e habitando ambientes aquáticos, sejam eles dulcícolas ou marinhos. (MCHUGH, 2003)

No ambiente aquático, as microalgas e as macroalgas desempenham papel ecológico análogo ao das plantas em ambiente terrestre. As algas são organismos de bioquímica complexa que servem como fonte de alimento para diversos animais, são hospedeiras de microrganismos e refúgio para mamíferos, peixes e invertebrados marinhos. Às algas também são atribuídas diversas características que as fazem um importante elemento comercial. Elas têm sido utilizadas como aditivos para rações animais, devido o elevado valor nutricional agregado; como fertilizantes, pelo seu alto teor de fibras capazes de reter umidade; como elementos para o tratamento de águas residuais, pela sua capacidade de retenção de íons de metal pesado e como componentes de diversos cremes e loções de uso cosmético ou farmacêutico, pelas propriedades reológicas de algumas de suas moléculas. Estudos recentes também vêm tentando fazer uso de algas como fontes para a obtenção de combustíveis.

A principal atividade humana relacionada ao uso de algas está centrada na alimentação, seja pelo consumo das algas propriamente ditas ou de substâncias extraídas das mesmas. Desde o século IV, o uso de algas marinhas como alimento é relatado em países do oriente. Tal uso vem se ampliando ao longo dos anos e isso pode ser justificado tanto pelo crescimento das populações orientais como também por sua migração ao redor mundo. Ou seja, tais povos levaram consigo seus hábitos alimentares e os popularizaram nas mais diversas culturas. A ampliação desse uso levou à devastação de diversos bancos de algas selvagens, o que impulsionou o estudo dos ciclos de vida de diversas espécies e propiciou o cultivo das mesmas. Anualmente, são cultivadas milhões de toneladas de algas úmidas, sendo a China o principal produtor. Este país sozinho tem uma produção média de cerca de 5 milhões de toneladas de algas por ano. (MCHUGH, 2003).

Algas marinhas também são utilizadas para a extração de hidrocolóides. Hidrocolóides são macromoléculas de origem natural com a capacidade de fácil dispersão em água, o que acarreta em um aumento de seu volume, de sua viscosidade e ocasionalmente conduz a um efeito gelificante. (DICKINSON, 1992). O uso de hidrocolóides é relatado desde o século XVII, quando foi descoberto o poder

de gelificação de algas submetidas à fervura. Desde então, o uso dos hidrocolóides extraídos de algas marinhas ganhou impulso e estes passaram a ser utilizados como espessantes e gelificantes na indústria alimentícia. Esta atividade econômica é responsável por movimentar, anualmente, bilhões de dólares. O alginato, a carragenana e o ágar são exemplos de hidrocolóides obtidos a partir de algas marinhas (MCHUGH, 2003).

O alginato, um ficocolóide encontrado na parede celular e no espaço entre as células das algas pardas, é um polissacarídeo com caráter ácido. Ele é formado por ácido D-manurômico e ácido L-gulurônico. O alginato desempenha um importante papel de retardar a dessecação das algas pardas. Seu principal uso é como espessante nas indústrias alimentícias, têxteis, cosméticas e de papel (BOLD; WYNNE, 1985).

Carragenanas são hidrocolóides bastante usados como agente estabilizante e emulsificante em tintas, cosméticos e laticínios (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). No Brasil a produção comercial ainda é considerada esporádica e pequena. A indústria brasileira, na década de 1990 chegou a importar, anualmente, cerca de duzentas toneladas de carragenana. A alga *Hypnea musciformis* vem sendo extensamente explorada para a extração deste hidrocolóide (SAITO; OLIVEIRA, 1990).

O ágar é bastante explorado comercialmente. Composto por resíduos de D e L-galactose, esse polissacarídeo é usado em diversos produtos alimentícios, como meio de cultura microbiológica, na formulação de cápsulas de vitaminas e drogas, e também como base para cosméticos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Diversas atividades biológicas podem ser atribuídas aos polissacarídeos de algas marinhas, sendo estas relacionadas ao tamanho da molécula, tipo de unidades constituintes e conteúdo de sulfato. A posição dos grupos sulfato, tipo de ligação e geometria da molécula também são importantes para as atividades biológicas (MELO; PEREIRA; FOGUEL; MOURÃO, 2004). Já foi relatado na literatura que muitos dos polissacarídeos extraídos de algas marinhas apresentam uma série de atividades biológicas tais como anticoagulante, antinociceptiva, antiinflamatória e antitumoral (WANG *et al.* 2010; VISHCHUK; ERMAKOVA; ZVYAGINTSEVA, 2011). Muitos trabalhos também mostram que essas moléculas são capazes de prevenir a oxidação nos sistemas biológicos (YE *et al.*, 2008; WANG

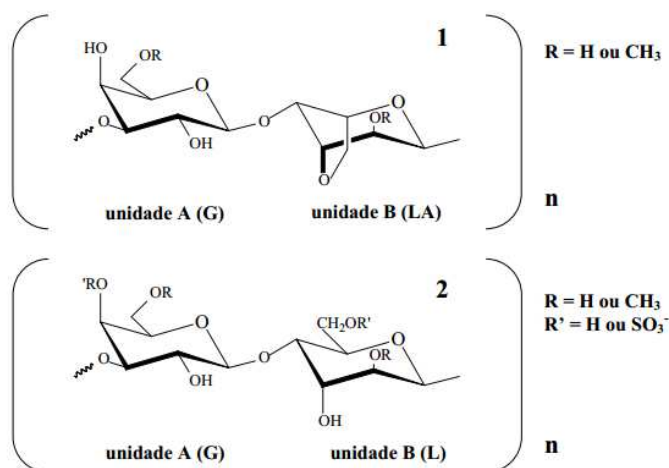
et al., 2010; BARAHONA *et al.*, 2011; COSTA, FIDELES, TELLES, 2011; YANG *et al.*, 2011 e VIJAYABASKAR, VASEELA, THIRUMARAN, 2012).

1.3 Ágar

O ágar é um biopolímero catiônico constituinte da matriz celular de algas. Nestes organismos, localiza-se em uma estrutura denominada agarócito. Tal estrutura está presente em algumas macroalgas vermelhas, destacando-se as algas das ordens *Gracilariales* e *Gelidiales*. (MOURADI-GIVERNAUD *et al.*, 1999; ALISTE, 2006; BORAL, BOHIDAR, 2009; GONZÁLEZ-LEIJA *et al.*, 2009).

O ágar é composto por unidades de agarose e unidades de agarpectina. A agarose é um polissacarídeo neutro, caracterizado por uma estrutura linear de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose (1→3)-β-D-galactose e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactose. Já a agarpectina caracteriza-se como um polissacarídeo ácido contendo sulfato, metil, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico adicionado à agarobiose (ARAKI, 1966 *apud* MARINHO-SORIANO, BOURRET, 2005). Estas estruturas podem ser observadas na **Figura 01**.

Figura 01. Estrutura química da agarose, também chamada de agarobiose (1) e da agarpectina (2). O primeiro polímero é formado por repetições de unidades (1→3)-β-D-galactose (unidade A) e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactose (unidade B) enquanto o segundo apresenta (1→3)-β-D-galactose como unidade A e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactose formando a unidade B com substituições por grupamentos metil ou sulfato nos átomos indicados.



O gel produzido a partir de ágar possui uma estrutura molecular em cadeia com conformação helicoidal, que leva à formação de uma rede com capacidade de reter considerável quantidade de moléculas de água nos interstícios. As ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os átomos de oxigênio presentes na galactopiranosose e na anidrogalactose são responsáveis pela estabilização da estrutura do gel (LAHAYE, ROCHA, 1991).

1.4 Radicais livres e antioxidantes

Radicaís livres são moléculas ou átomos simples que têm um elétron desemparelhado externo à sua órbita. Assim, tais átomos têm estabilidade diminuída, o que amplia sua capacidade de reagir com outras moléculas ou átomos, sobretudo lipídios celulares, proteínas e bases nucleicas (MARLIN *et al.* 2002 *apud* FERNANDES, RODRIGUES, MICHIMA, SIQUEIRA, 2012).

Os radicaís livres mais expressivos são as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs). As EROs incluem espécies radicalares, tais como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), radical peroxila (ROO^{\cdot}), e não-radicalares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxido orgânico (ROOH), oxigênio singlete (1O_2) e ozônio (O_3). As ERNs incluem espécies tais como óxido nítrico (NO), peroxinitrila ($ONOO^{\cdot}$), ácido peroxinitroso (ONOOH) e dióxido de nitrogênio (NO_2) (SILVA, CERCHIARO, HONORIO, 2011).

Os organismos possuem mecanismos para manter sob controle as concentrações de radicaís livres sob controle. Estes, quando em pequenas concentrações, atuam como importantes sinalizadores celulares. Entretanto, quando ocorre exagerada produção de radicaís livres ou quando o organismo falha em destruir o excesso de tais compostos, o organismo pode entrar em um quadro denominado de estresse oxidativo no qual ocorre a ação danosa das EROs e ERNs sobre as células (SILVA, CERCHIARO, HONORIO, 2011).

O estresse oxidativo pode levar a lesões de diversas macromoléculas e, por isso, a este fenômeno são atribuídos diversos quadros patológicos, como complicações pulmonares, cardíacas, doenças vasculares e neoplásicas (OLIVEIRA, SCHOFFEN, 2010). Além dos processos endógenos, diversos fatores ambientais atuam como produtores de radicaís livres, tais como a dieta desequilibrada, o

excesso de álcool, tabaco e ainda a poluição atmosférica. (OLIVEIRA, SCHOFFEN, 2010).

Antioxidantes são compostos que possuem habilidade para prevenir, interceptar ou reparar o dano oxidativo às macromoléculas, danos estes causados por radicais livres (CONTRAN *et al.* 2000).

Os antioxidantes são divididos em dois grupos: os enzimáticos e os não-enzimáticos. As principais enzimas com atividade antioxidante são a superóxido desmutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase (POX) (HUANG *et al.*, 2007 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2011). Já dentre os antioxidantes não enzimáticos destacam-se os compostos fenólicos, o ácido ascórbico e os carotenóides (HASSIMOTTO *et al.*, 2005 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Vêm sendo buscados continuamente, por diversos grupos de pesquisa, polissacarídeos com potencial antioxidante (CHENG *et al.*, 2013; DORE *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013; WU, WU, QU, LI, YAN, 2013; YANG, YANG, GUO, JIAO, ZHAO, 2013; ZHANG, WANG, WANG, MA, ZENG, 2012). Tal busca se dá principalmente porque os compostos antioxidantes sintéticos tradicionalmente usados nas indústrias alimentícia e farmacêutica como o Butilato Hidroxitolueno (BHT), Butilato de Hidroxianisol (BHA), e Terc-Butil-hidroquinona (TBHQ) têm seu uso limitado. Tal limitação é justificada pelas suspeitas que recaem sobre estes compostos de serem causadores de danos às células hepáticas e também por demonstrarem potencial carcinogênico (CHENG *et al.*, 2013; KUMAR, LIN, TANG, 2008; SOUZA *et al.*, 2011).

As condições ambientais às quais as algas marinhas são constantemente submetidas (variações de oxigênio, temperatura e insolação) sugerem que tais organismos possuem compostos com atividade antioxidante. Diversos trabalhos apontam que tal atividade deve-se aos polissacarídeos sulfatados, constituintes das estruturas destes protistas (COSTA, FIDELIS, TELLES, 2011; WANG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2011; YE *et al.*, 2008).

1.5 Qualidades do Ágar e Reologia

Os géis obtidos a partir do ágar podem ser classificados como fortes ou fracos. O gel fraco tem forma pouco estruturada, quando comparado ao gel forte, que tem maior capacidade de força. O ágar que resulta em um gel fraco é bastante utilizado

como agentes espessante, emulsionante, e gelificante em alimentos. Já o ágar que origina um gel forte é comumente utilizado como meio de cultura sólido para plantas, propagação de bactérias e géis para separação e análise de moléculas em biologia molecular (LORBEER, THAM, ZHANG, 2013).

O gel de ágar de maior força é obtido a partir das algas dos gêneros *Pterocladia* e *Gelidium*. A produção de ágar, entretanto, está centrada nas espécies do gênero *Gracilaria*. As algas do gênero *Gracilaria* são responsáveis por cerca de 53% de todo o ágar produzido mundialmente (MARINHO-SORIANO, BURRET, 2003). A importância das *Gracilarias* para esta produção pode ser atribuída aos mecanismos simples e baratos utilizados para seu cultivo.

Os géis de ágar obtidos a partir das algas do gênero *Gracilaria* são considerados fracos quando comparados aos obtidos de outras algas, como as do gênero *Gelidium*.

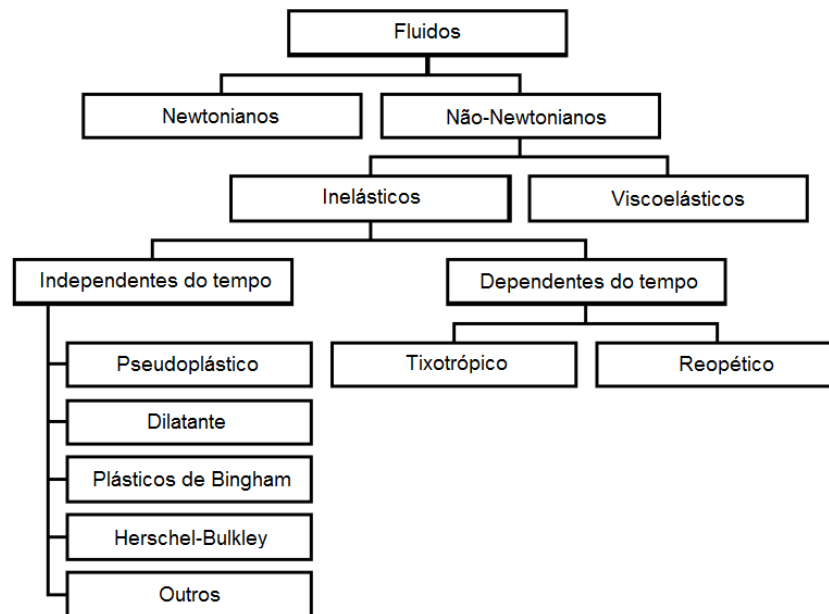
A força dos géis produzidos pelas *Gracilarias*, entretanto, pode ser aumentada por meio de um pré-tratamento alcalino da alga antes da extração dos polissacarídeos (FREILE-PELEGRÍN, MURANO, 2005). Os tratamentos químicos alcalinos aos quais são submetidas as algas do gênero *Gracilaria* agem nas cadeias polissacarídicas, diminuindo seu grau de sulfatação e aumentando o teor de 3,6 anidrogactose. Estes tratamentos também auxiliam na remoção de proteínas e pigmentos do ágar obtido. Tais tratamentos e as modificações advindas destes garantem uma maior qualidade do gel de ágar e agregam valor comercial a este produto (ARMISEN, GALATAS, 1987; DURAIRATNAM *et al.*, 1990; ROLEDA *et al.*, 1997; VILLANUEVA *et al.*, 1999; HAYASHI, 2001; PRASSAD *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-LEIJA *et al.*, 2009).

Geralmente, as forças destes géis podem ser relacionadas ao nível de sulfato. Quando o ágar possui um menor grau de sulfatação, ou maior grau de sulfato substituído, maior a força que o gel apresenta (LAHAYE, ROCHA, 1991). Por meio de experimentos de reologia é possível fazer a classificação dos fluidos.

A reologia é um ramo da Física que estuda as respostas dadas por determinados materiais frente a uma tensão ou deformação externa (TOLEDO, 1991). As propriedades reológicas dos materiais são determinadas por medidas de força e deformação em função do tempo (CANOVÁS, MUNIZAGA, 2005).

A classificação reológica dos fluidos, que leva em consideração o comportamento da relação taxa de deformação/tensão de cisalhamento, subdivide os materiais em newtonianos e não-newtonianos (STEFFE, 1996) e pode ser observado na **Figura 02**.

Figura 02. Classificação do comportamento reológico dos fluidos.



Fonte: STEFFE, 1996.

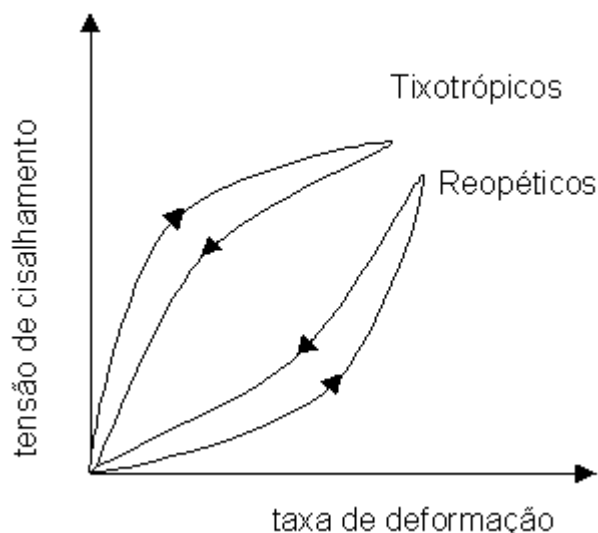
Quanto à relação entre taxa de cisalhamento e a taxa de deformação os fluidos são classificados como newtonianos e não-newtonianos. Os fluidos são newtonianos quando possuem viscosidade constante, e não-newtonianos quando não possuem constância na relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação. Os fluidos não-newtonianos podem ser classificados em viscoelásticos ou inelásticos (SCHRAMM, 2006).

Os fluidos viscoelásticos apresentam características de materiais sólidos e elásticos como as gelatinas, as massas de farinha de trigo e alguns tipos de queijos. Os inelásticos podem ser dependentes ou independentes do tempo caso suas propriedades reológicas variem ou não conforme o tempo de aplicação das tensões.

Os fluidos inelásticos dependentes do tempo podem ser tixotrópicos ou reopéticos. Os fluidos tixotrópicos apresentam uma diminuição reversível do tempo necessário para que forças tangenciais mantenham uma taxa de deformação constante, a uma temperatura também constante. Os reopéticos se apresentam de

maneira inversa aos tixotrópicos. Curvas de escoamento de fluidos tixotrópicos e reopéticos podem ser observadas na **Figura 03**.

Figura 03. Curva de escoamento de fluidos não-newtonianos de propriedades dependentes do tempo de cisalhamento.



Fonte: <http://www.setor1.com.br>

A tixotropia dos materiais pode ser medida pelos testes da curva de histerese (BARNES, 1997). A área de histerese é uma área delimitada pelas curvas ascendentes e descendentes na curva de fluxo. Esta área será proporcional à energia requerida para a quebra da estrutura tixotrópica, sendo esta área igual a zero caso os fluidos não alterem sua viscosidade em função do tempo (BARNES, 1997, SCHRAMM, 2006).

Os fluidos inelásticos independentes do tempo não dependem do tempo de aplicação da tensão de cisalhamento e são classificados em Pseudoplásticos, Dilatantes, Plásticos de Bingham e Herschel-Bulkley.

Os Plásticos de Bingham e os Herschel-Bulkley necessitam de uma tensão inicial para começar a escoar e não possuem uma relação de linearidade entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação (SCHRAMM, 2006).

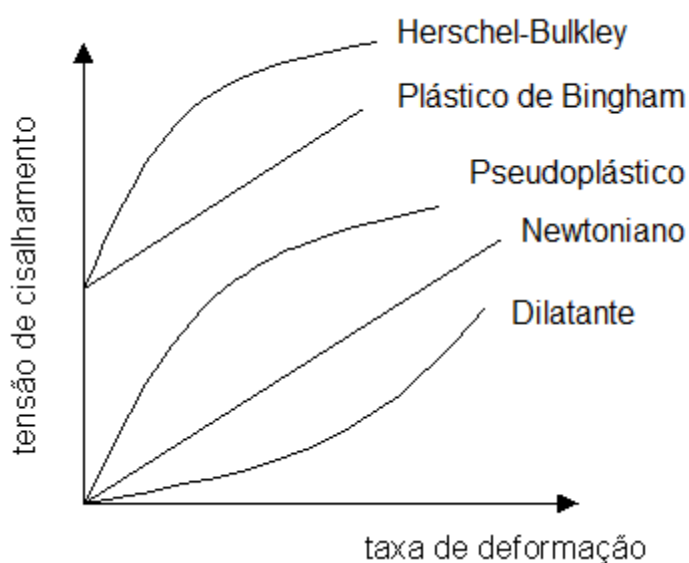
Os fluidos Pseudoplásticos são substâncias que, quando em repouso, têm um estado molecular desordenado. Quando estes materiais são submetidos a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força

aplicada. Desta forma, a tensão aplicada e o ordenamento das moléculas estão em uma relação direta. Quanto maior a tensão aplicada, maior será a ordenação. Assim, quanto maior a tensão sofrida pelo material pseudoplástico, menor a viscosidade do mesmo. São exemplos de substâncias pseudoplásticas as polpas de frutas, os caldos de fermentação e o melaço de cana.

Os fluidos Dilatantes têm um comportamento inverso ao dos Pseudoplásticos. Dessa forma, os fluidos Dilatantes aumentam a viscosidade com o incremento das tensões. São exemplos de fluidos Dilatantes soluções de amido e soluções de farinha de milho e açúcar.

Curvas de escoamento que representam os fluidos newtonianos e fluidos não-newtonianos independentes do tempo (Herschel-Bulkley, Plásticos de Bingham, Dilatante e Pseudoplástico) podem ser observadas na **Figura 04**.

Figura 04. Curva de escoamento de fluidos newtonianos e não-newtonianos de propriedades independentes do tempo de cisalhamento.



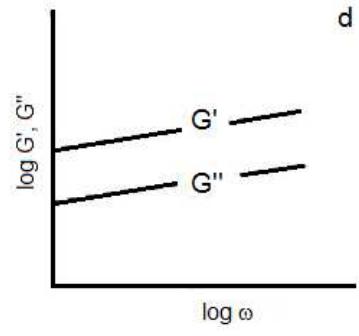
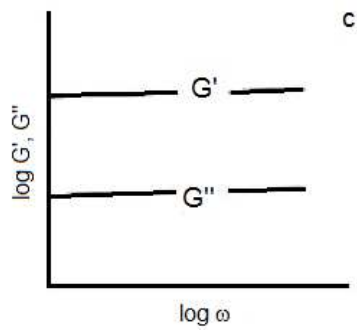
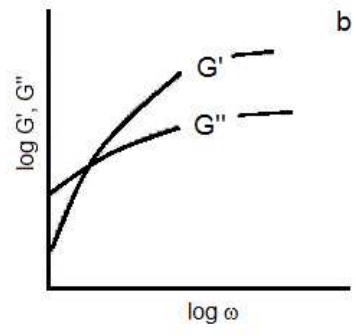
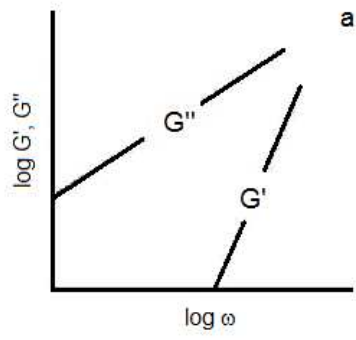
Fonte: <http://www.setor1.com.br>

As curvas de escoamento são bastante úteis para desenvolver produtos, controlar sua qualidade de produção e na aceitação por parte dos consumidores.

Além das curvas de escoamento, são importantes os ensaios oscilatórios (dinâmicos). Os ensaios oscilatórios permitem avaliar a estabilidade das suspensões, pois fornecem parâmetros relacionados ao comportamento da estrutura

do material, uma vez que utiliza baixas taxas de deformação, o que tem similaridade com os processos de sedimentação das partículas em suspensão. As respostas dos ensaios oscilatórios são os módulos de armazenamento (G') e os módulos de dissipação (G''), que são obtidos em função da frequência (ω), produzindo um espectro mecânico (GIBOREAUS, 1994). Para a realização dos testes oscilatórios com a finalidade de determinar as propriedades viscoelásticas dos materiais, são efetuadas duas etapas distintas e independentes, a varredura de tensão e a varredura de frequência. A varredura de tensão determina o intervalo viscoelástico linear e ocorre quando à amostra é aplicada uma tensão com frequência de oscilação e temperaturas constantes, registrando-se os valores de G' e G'' . Tal teste determina a máxima tensão que pode ser aplicada ao material sem que ocorra ruptura da sua estrutura interna. Já a varredura de frequência, realizada dentro do intervalo viscoelástico linear determinado nos testes de varredura de tensão, é usada para caracterizar a conformação e as interações intermoleculares dos materiais em diferentes estados de coesão, registrando-se os valores de G' e G'' , em função da frequência aplicada. Tais ensaios permitem a classificação dos materiais em solução diluída, solução concentrada, gel fraco e gel forte, conforme seja a relação entre G' e G'' (SATO, CUNHA, 2007), conforme pode ser observado na **Figura 05**.

Figura 05. Espectros mecânicos típicos de quatro sistemas: (a) solução diluída, (b) solução concentrada, (c) gel forte e (d) gel fraco.



Fonte: Alves, 2003.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar experimentos de composição química, de aspectos químico-estruturais, de avaliação de atividade antioxidante e do comportamento reológico de frações polissacarídica obtidas a partir da alga vermelha *Gracilaria intermedia*.

2.2 Objetivos Específicos


- Estabelecer composição centesimal da alga seca.
- Realizar extrações de fração polissacarídica da alga *Gracilaria intermedia* por digestão por papaína, extração sem pré-tratamento e extrações com pré-tratamentos por NaOH e KOH, a frio e a quente, nas concentrações de 1% e 5%.
- Calcular o rendimento de polissacarídeos obtidos.
- Determinar o teor de sulfato, proteínas, carboidratos e 3,6-anidrgalactose em todos os materiais obtidos a partir dos diferentes métodos de extração propostos.
- Caracterizar estruturalmente as frações polissacarídicas através de Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C , ^1H e 2D ^1H COSY).
- Avaliar o efeito dos materiais em estudo quanto a sua atividade antioxidante *in vitro*, realizando os testes de Capacidade Antioxidante Total e de Quelação do íon Ferroso.
- Verificar o comportamento reológico das frações polissacarídicas extraídas (em solução aquosa) em testes estacionário e oscilatório dinâmicos.

3. MATERIAIS

3.1 Coleta e identificação da alga marinha

Exemplares de *Gracilaria intermedia* (registrada sob o número 2386 no herbário ficológico do Laboratório de Ciências do Mar – Labomar, Universidade Federal do Ceará) foram coletados na Praia da Taíba, município de São Gonçalo – em abril/2013, durante maré baixa, e conduzidos ao Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), em sacos plásticos. No laboratório, as algas foram limpas de epífitas e demais organismos incrustantes, lavadas com água destilada e secas, a 25 °C. O aspecto macroscópico da alga e sua classificação taxonômica podem ser observados na **Figura 06**.

Figura 06. Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha *Gracilaria intermedia* e sua classificação taxonômica.

	Filo	Rhodophyta	
	Subfilo	Eurhodophytina	
	Classe	Florideophyceae	
	Subclasse	Rhodymeniophycidae	
	Ordem	Gracilariales	
	Família	Gracilariaceae	
	Gênero	Gracilaria	
	Nome Botânico	<i>Gracilaria</i> <i>intermedia</i> J.Agardh 1901	

Fonte: Autor/ Algaebase, 2013.

3.2 Soluções e reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. Os reagentes e soluções utilizadas foram:

2,2'-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio, 2,2-difenil-1-picrilidrazila, ácido ascórbico, ácido clorídrico, ácido etilenodiamino tetra-acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, água deuterada, albumina sérica bovina, azul de comassie, brometo de potássio, cisteína, cloreto de bário, cloreto de cetilpiridínio, cloreto de sódio, cloreto férrico, etanol, fenol, ferrozina, fosfato de sódio, frutose, galactose, gelatina, hexano, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, metanol, molibdato de amônio, papaína, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de sódio, tampão acetato de sódio, tetrametilsilano, timol, zinco.

4. MÉTODOS

4.1 Composição centesimal

4.1.1 Umidade

Para a determinação da umidade, 4 g de *Gracilaria intermedia* seca tiveram massa aferida em pesa-filtro. Em seguida, o pesa-filtro contendo o material em estudo foi disposto em estufa a 105 °C, durante 12 h e, após seu equilíbrio térmico, a massa foi novamente aferida. A umidade foi determinada comparando-se a quantidade de massa existente no início e no final de todo o experimento (A.O.A.C, 1990).

4.1.2 Cinzas

Porção de 4 g de amostra seca (proveniente do teste de umidade), em cadinho de porcelana, foi inserida em forno mufla, a 550 °C e lá permaneceu por 4 h. Tal procedimento permitiu completa mineralização e carbonização da amostra. O cadinho, então, foi retirado da estufa e mantido em dessecador até que fosse atingida a temperatura ambiente. Em seguida, ocorreu pesagem do material obtido, que constitui a quantidade de cinzas presente na amostra (A.O.A.C, 1990).

4.1.3 Proteína Bruta

Em balão de Kjeldhal, foram inseridos 2 g de amostra, 30 mL de H₂SO₄, 0,5 g de CuSO₄ e 9,5 g de Na₂SO₄. Tal sistema foi levado a digestor, por 30 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se ao balão 200 mL de água destilada, 1,0 g de zinco e 100 mL de solução de NaOH 40 %. Tal mistura foi reduzida em 1/3, por destilação e, posteriormente, titulada com NaOH a 0,1 mol.L⁻¹. Como solução receptora foram utilizados 50 mL de ácido sulfúrico 0,1 mol.L⁻¹ e como indicador o vermelho de metila (A.O.A.C, 1990).

4.1.4 Lipídios

Amostras secas da alga marinha em estudo foram dispostas em equipamento extrator juntamente com 100 mL de hexano, durante 8 h. Ocorreu, em seguida, evaporação parcial do solvente em banho maria a 70 °C, manutenção da amostra em estufa a 100 °C e pesagem do material. A percentagem de lipídios da amostra foi calculada fazendo-se a diferença entre pesagens realizadas no início e no final do experimento. (A.O.A.C, 1990).

4.1.5 Carboidratos Totais

Os carboidratos totais foram obtidos por diferença segundo o método de Pearson (1976) pelo emprego da seguinte equação:

$$\% \text{ Carboidratos} = (100\% \text{ da matéria seca}) - [(\% \text{ Lipídeos}) + (\% \text{ Cinzas}) + (\% \text{ Proteínas})]$$

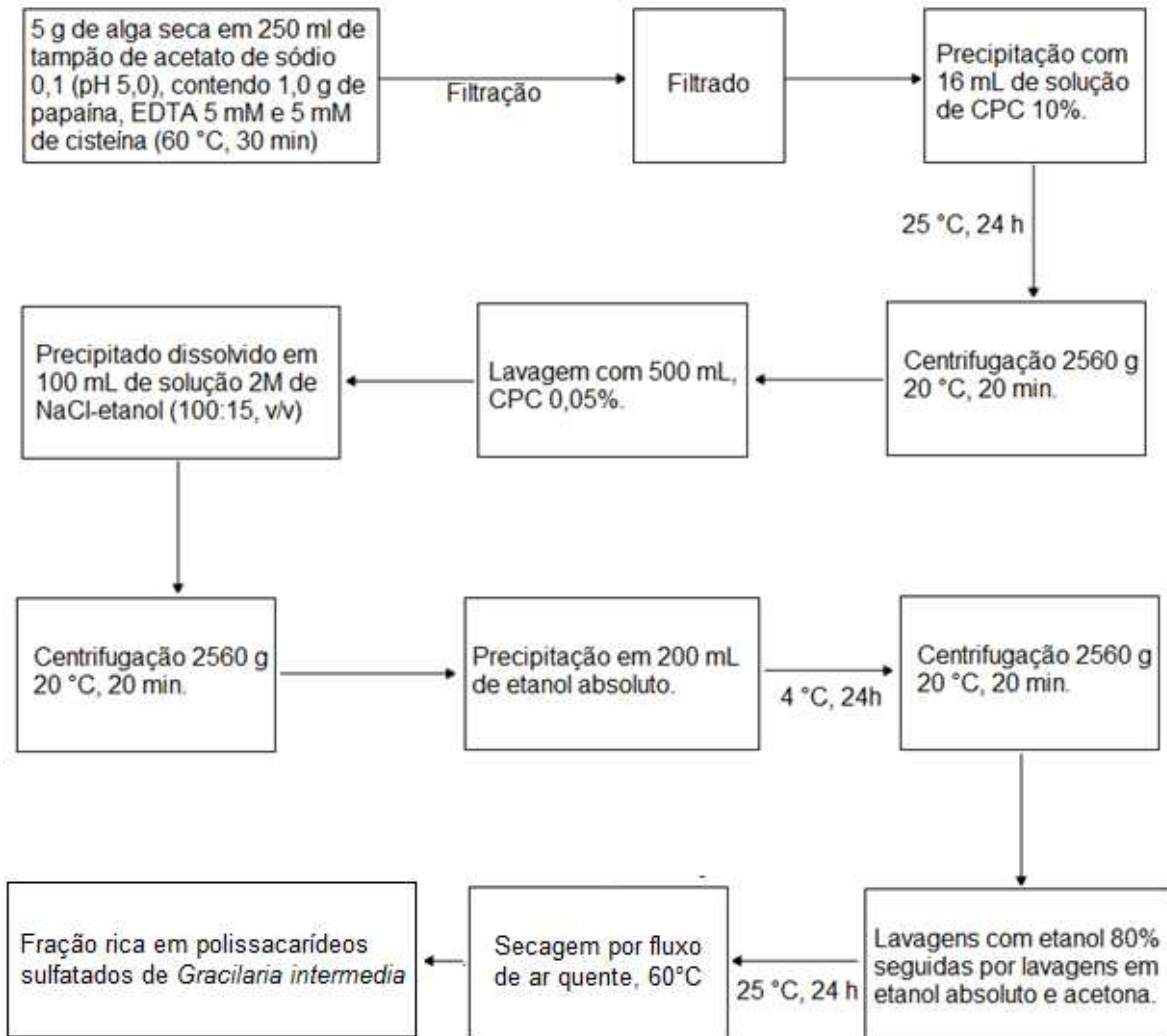
4.2 Extração de polissacarídeos

4.2.1 Extração por digestão com papaína (Enzimática)

A extração dos polissacarídeos ocorreu segundo a metodologia de Farias, Valente, Pereira, Mourão (2000) com modificações. Alga seca (5 g) foi suspensa em 250 mL de tampão de acetato de sódio 0,1 (pH 5,0), contendo 1,0 g de papaína, EDTA 5 mM e 5 mM de cisteína e incubou-se a 60 °C durante 30 min. A mistura de incubação foi então filtrada por uma membrana de nylon, e o homogeneizado foi guardado. Os polissacarídeos sulfatados em solução foram precipitados com 16 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) 10%. Após 24 h à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 2560 × g durante 20 min a 20 °C. Os polissacarídeos sulfatados foram lavados com 500 mL de solução de 0,05% de CPC, dissolvido em 100 mL de uma solução 2 mol.L⁻¹ de NaCl-etanol (100: 15, v / v). Os polissacarídeos de tal mistura foram precipitados com 200 mL de etanol

absoluto. Após 24 h, a 4 °C, o precipitado foi recolhido por centrifugação (2560 x g durante 20 min a 20 °C) e lavado exaustivamente com etanol a 80%, etanol absoluto e acetona. Seguindo-se secagem por fluxo de ar quente (60 °C).

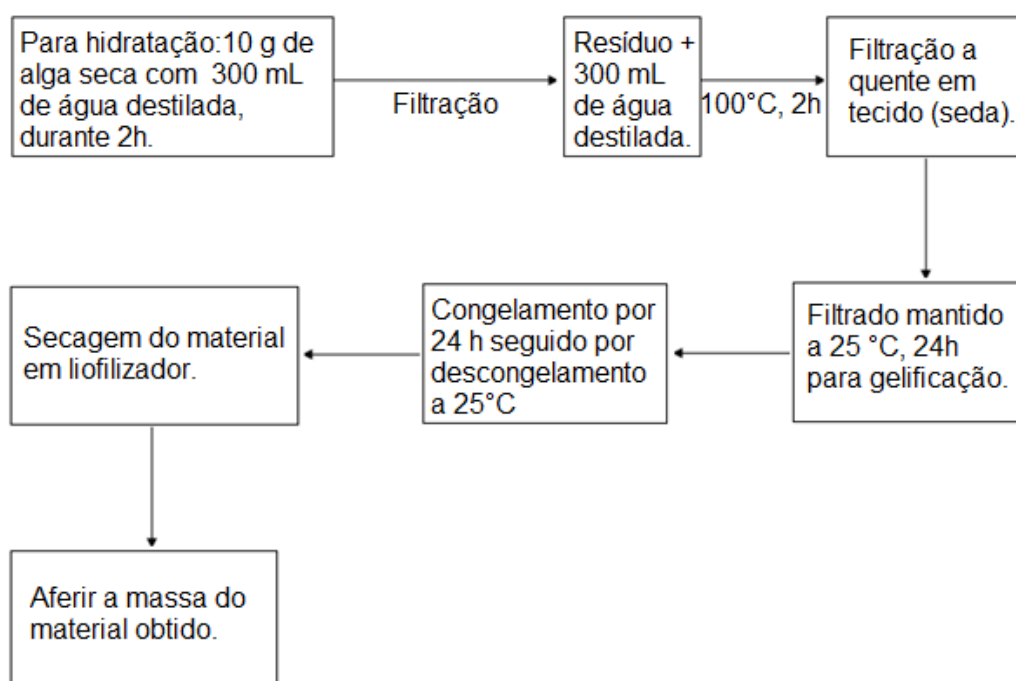
Figura 07. Esquema de extração enzimática de polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria intermedia*.



4.2.2 Extração sem pré-tratamento (Nativa)

Para a extração sem pré-tratamento, seguiu-se metodologia proposta por Marinho-Soriano, Bourret, Casabianca, Maury (1999), com modificações. Para tal, 10 g de alga seca foram hidratadas com 300 mL de água durante 2 h. Seguiu-se filtração, sendo a água desprezada e sendo adicional mais 300 mL de água destilada à alga. Tal mistura foi, em banho-maria, submetida à temperatura de 100 °C, por 2h. Ocorreu filtração em seda e o material resultante foi deixado em placa de petri, por 24 h a 25 °C, para gelificação. Ocorreu então o congelamento (-20 °C) e descongelamento (25 °C) do material, que foi seco e em liofilizador. Seguiu-se sua pesagem para avaliação do rendimento da extração.

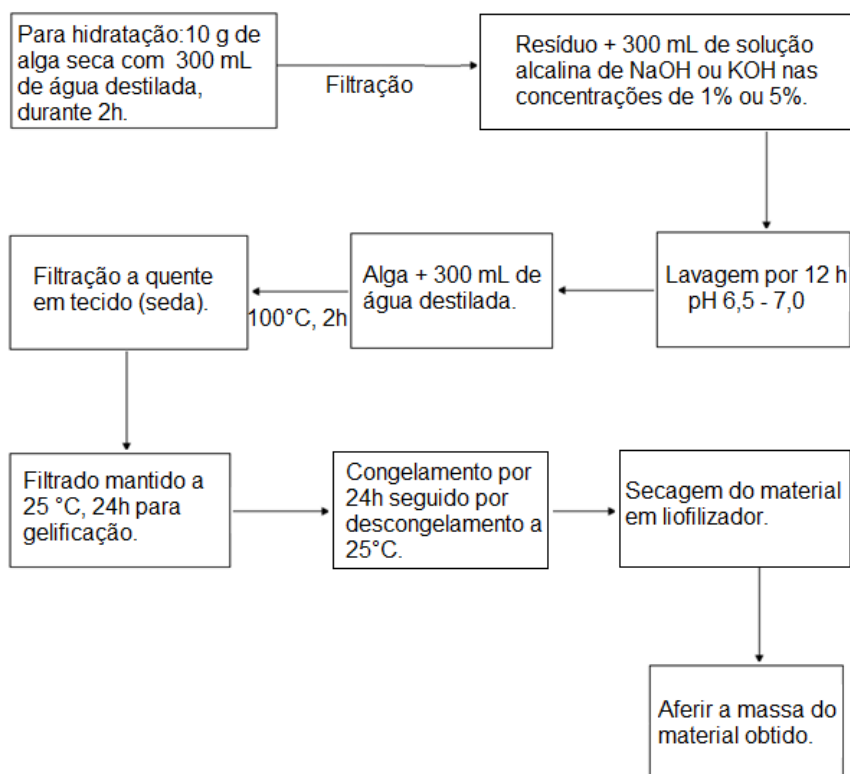
Figura 08. Esquema de extração sem pré-tratamento.



4.2.3 Extração de polissacarídeos com o pré-tratamento alcalino, a frio, da alga *Gracilaria intermedia*.

As extrações de ágar com o pré-tratamento alcalino a frio ocorreu conforme metodologia proposta por Gerund, Kamura, Ohno(1997), com modificações. Quatro porções de 10 g de alga foram hidratadas em 300 mL de água durante 2 h, 25 °C. As misturas foram filtradas e às algas foram adicionados 300 mL de solução alcalina (NaOH 1,0 % - preparo 01 - NaOH 5,0 % - preparo 02 - KOH 1,0% - preparo 03 - KOH 5,0% - preparo 04). Estes sistemas foram mantidos a 25 °C, por 2 h. As algas foram, então, lavadas durante 12 h ou até que seu pH estivesse entre 6,5 e 7,0. Adicionou-se, então, 300 mL de água a cada porção de alga. Tais misturas foram, em banho-maria, submetidas à temperatura de 100 °C, por 2 h. As misturas obtidas foram filtradas ainda quentes, em seda, e os filtrados resultantes foram deixados em placa de petri, 25 °C, 24 h. Ocorreu então o congelamento (-20 °C) e descongelamento (25 °C) dos materiais, que foram secos em liofilizador. Seguiu-se pesagem dos materiais obtidos para avaliação dos rendimentos das extrações.

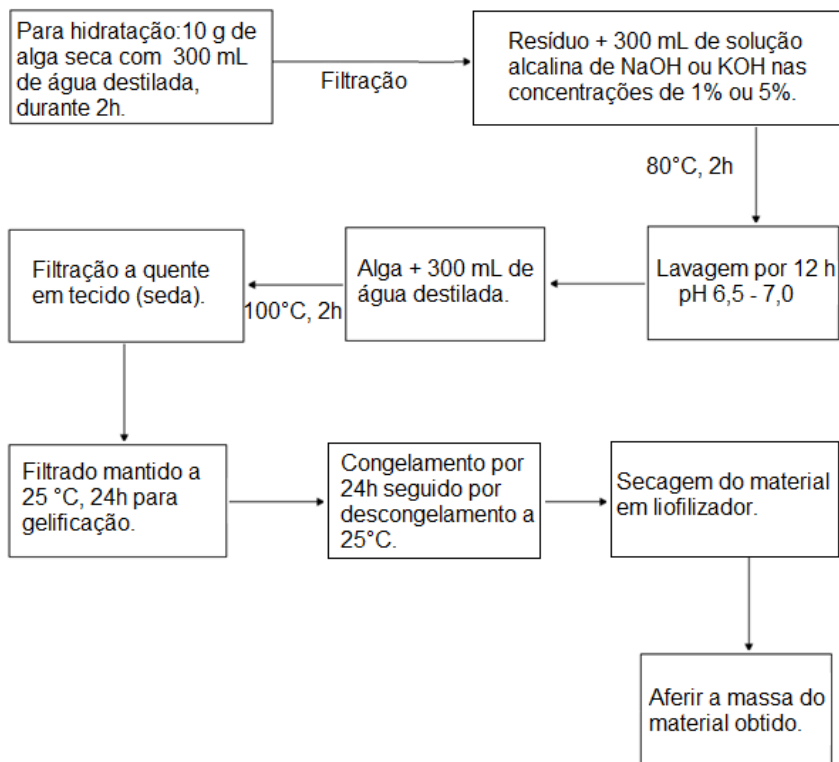
Figura 09. Esquema de extrações que tiveram a alga pré-tratada com soluções alcalinas, a frio.



4.2.4 Extração de polissacarídeos com o pré-tratamento, a quente, da alga *Gracilaria intermedia*

As extrações de ágar com o pré-tratamento alcalino a quente ocorreu conforme metodologia proposta por Rebello *et al.*(1997), com modificações. Quatro porções de 10 g de alga foram hidratadas em 300 mL de água durante 2 h, 25 °C. As misturas foram filtradas e às algas foram adicionados 300 mL de solução alcalina (NaOH 1,0% - preparo 01 - NaOH 5,0% - preparo 02 - KOH 1,0% - preparo 03 - KOH 5,0% - preparo 04. Estes sistemas foram mantidos por 2 h, a 80 °C. As algas foram, então, lavadas durante 12 h ou até que seu pH estivesse entre 6,5 e 7,0. Adicionou-se, então, 300 mL de água destilada a cada porção de alga. Tais misturas foram, em banho-maria, submetidas à temperatura de 100 °C, por 2 h. As misturas obtidas foram filtradas ainda quentes e os materiais resultantes foram deixados em placa de petri, 25 °C, 24 h. Ocorreu então o congelamento (-20 °C) e descongelamento dos materiais (25 °C), que foram secos em liofilizador. Seguiu-se pesagem dos materiais para avaliação do rendimento das extrações.

Figura 10. Esquema de extrações que tiveram a alga pré-tratada com soluções alcalinas, a quente.



4.3 Rendimento

Para cálculo do rendimento da fração obtida foi utilizada a seguinte fórmula.

$$\text{Teor de polissacarídeos \%} = \frac{\text{massa (g) do material seco obtido}}{\text{massa (g) de macroalga seca utilizada para o processo de extração}} \times 100$$

4.4 Caracterização de composição química

Para a realização dos testes de composição química, foi utilizado espectrofotômetro Thermo Spectronic Genesys 20, Usa.

4.4.1 Determinação de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada segundo do método proposto por Bradford (1976).

O preparo da solução de Bradford ocorreu pelo seguinte procedimento: 50,0 mg de Comassie G-250 foram dissolvidos em 25,0 mL de álcool etílico e a solução obtida, agitada durante 1 h em erlenmeyer envolto com papel alumínio. Seguiu-se a adição de 50,0 mL de ácido fosfórico 85 %. O volume foi então aferido para 500 mL com o uso de água destilada. A solução resultante foi filtrada três vezes com papel de filtro e acondicionada em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Procedeu-se confecção da curva padrão com Albumina Sérica Bovina (BSA) pela mistura de 1,0 mL de solução de BSA em diferentes concentrações e 2,5 mL de solução de Bradford. Após 10 min, as soluções obtidas foram analisadas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. Todas as concentrações foram analisadas em triplicata.

Para que a quantidade de proteína das amostras fosse dosada, foram utilizadas solução de 1,0 mg.mL⁻¹ de polissacarídeos diluída nas seguintes proporções 1:10, 1:50 e 1:100. A tais soluções foram adicionados o reagente de Bradford e feitas leituras em espectrofotômetro a 595 nm. Para a estimativa das concentrações de proteína foi realizada correlação entre as leituras obtidas com as soluções contendo a amostra e as da curva padrão.

4.4.2 Determinação de Carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi determinado seguindo o método de Dubois *et al.* (1956). Utilizou-se uma curva de calibração. Para a confecção desta, galactose foi usada como padrão.

Foi preparada uma solução de partida ($0,0004 \text{ g.mL}^{-1}$) com o padrão galactose e procedeu-se confecção da curva de calibração. Cada um dos pontos desta curva foi obtido pela leitura, em espectrofotômetro, 490 nm, de soluções preparadas com 500,0 μL de solução de galactose em diferentes concentrações; 0,5 mL de solução de Fenol (5 %) e 2,5 mL de solução concentrada de ácido sulfúrico (95,5 %).

Cada uma das amostras em estudo foi preparada na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Estas soluções foram então diluídas na proporção volumétrica 1:9 e realizou-se procedimento citado no parágrafo anterior. A quantificação de galactose ocorreu por correlação com a curva de calibração. Cada um dos ensaios foi realizado em triplicata.

4.4.3 Quantificação de 3,6 anidrogactose

Para quantificação de 3,6 anidrogactose utilizou-se metodologia proposta por Matsuhiro (1995). Para o ensaio, utilizou-se solução de timol 5 % em etanol 98 % e solução de cloreto férrico a 0,5 % em HCl concentrado. Curva padrão foi obtido com frutose como padrão.

Diluiu-se 10 mg de cada uma das amostras de polissacarídeo foi diluída em um volume de 50 mL de água destilada, em banho-maria ($95 \text{ }^{\circ}\text{C} - 100 \text{ }^{\circ}\text{C}$) até completa dissolução do material; a tal preparação deu-se o nome de solução estoque.

A tubos de ensaio de 30 mL, adicionou-se 2 mL de água destilada; 0,5 mL de solução de Timol 5 %, 5 mL de solução de Cloreto Férrico 0,5 % e 2 mL da solução estoque das amostras. Tais tubos foram aquecidos, a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 13 min e resfriadas em banho de gelo. Acrescentou-se 10 mL de álcool etílico 98% a cada um dos tubos em experimentação, seguiu-se agitação.

Realizou-se leitura das soluções obtidas em espectrofotômetro, a 635 nm e os percentuais de 3,6 anidrogactose foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$3,6 \text{ AG (\%)} = ((\text{Abs} / \text{ICP}) \times (\text{VS} / (\text{PA} \times \text{AL})) \times 100$$

3,6AG (%)= Teor percentual de 3,6 anidrogactose

Abs = Leitura da absorbância no comprimento de onda 635nm

ICP = Inclinação da curva padrão

VS = Volume total da solução estoque preparada em mL

PA = Peso do polissacarídeo seco utilizado na análise em mg

AL = Alíquota da solução estoque utilizada para a análise em mL

O ensaio foi feito em triplicata para cada uma das amostras.

4.4.4 Determinação de Sulfato

O teor de sulfato foi determinado por meio de hidrólise ácida em HCl 1,0 mol.L⁻¹ (105 – 110 °C, 5 h) e turbidimetria a 500 nm, pelo método de gelatina-bário (DODGSON, PRICE, 1962). Para tal procedimento, 200 mg de gelatina foram dissolvidos em 40 mL de água a 70 °C e esta solução foi mantida em geladeira durante 12 h; seguiu-se a adição de 200 mg de cloreto de bário ao fluido, e esta solução foi novamente acondicionada em geladeira por um período de 2 h. Seguiu-se a mistura de hidrolisado de polissacarídeos ou diferentes concentrações da solução padrão (curva de calibração), HCl 1,0 mol.L⁻¹, ácido tricloroacético 3 % e solução gelatinosa. Após 20 min em temperatura ambiente, as soluções obtidas no processo acima citado tiveram leitura de absorbância aferidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 500 nm. Confeccionou-se curva de calibração com o uso de sulfato de sódio anidro como padrão. A quantificação de sulfato livre em cada uma das amostras obtidas ocorreu por correlação com a curva de calibração. Cada um dos ensaios foi realizado em triplicata.

4.5 Caracterizações da amostra por métodos espectroscópicos

4.5.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros das frações polissacarídicas foram obtidos através da dispersão das amostras em pastilhas de KBr e, para obtenção do espectro, foi utilizado um Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier da Shimadzu, modelo FTIR-8300, apresentando uma janela espectral de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.5.2 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C é um método bastante eficiente para analisar a estrutura de polissacarídeos de algas (LAHAYE, YAPHE, VIET, ROCHAS, 1989; MILLER, FURNEAUX, 1997; USOV, YAROTSKY, SHASHKOV, 1980; VALIENTE *et al.*, 1992).

Os espectros de ^{13}C , ^1H e 2D ^1H COSY RMN foram obtidos pela diluição do material em D_2O e gravados a 353 K em espectrometro Bruker Avance DRX 500 com transformada de Fourier.

4.6 Atividade antioxidante

4.6.1 Capacidade antioxidante total

O teste de capacidade antioxidante total foi baseado na redução de Mo^{6+} a Mo^{5+} , foi realizado conforme a metodologia proposta por Prieto, Pineda, Aguilar (1999). Alíquotas da solução de polissacarídeos (0,1 mL) em diferentes concentrações (1,0 mg.mL^{-1} a 15,0 mg.mL^{-1}) foram misturados com 1,00 mL da solução reagente (0,6 mol.L^{-1} de ácido sulfúrico, 28,0.10⁻³ mol.L^{-1} de fosfato de sódio e 4,0 10⁻³ mol.L^{-1} de molibdato de amônio). Seguiu-se incubação a 95 °C durante 90 min. Posteriormente, a absorbância de cada uma das amostras obtidas foi lida a 695 nm. Uma curva padrão nas mesmas condições foi preparada com soluções de ácido ascórbico. Assim, os resultados são apresentados na forma de equivalência de ácido ascórbico (EAAsc).

4.6.2 Quelação do íon ferroso

O íon ferro está associado com a peroxidação de lípidos devido à reação de Fenton. Este processo está relacionado a uma série de doenças (CHUN-HUI, CHANG-HAI, ZHI-LIANG, YI, 2007; QI *et al*, 2005; ZHANG, WANG, ZHANG, ZHAO, 2011). A formação de um complexo entre compostos antioxidantes e este íon, dessa forma, inviabiliza que este reaja com macromoléculas e, conseqüentemente, cause danos às células (MOURADI-GIVERNAUD *et al.*, 2013). A atividade quelante de íon ferroso dos polissacarídeos sulfatados foi investigada de acordo com a metodologia usada por Zhang, Wang, Wang, Ma, Zeng (2012). Alíquotas de 1,0 mL de soluções polissacarídicas em diferentes concentrações (2,5 mg.mL⁻¹ a 15,0 mg.mL⁻¹) foram misturados com 0,05 mL de FeCl₂ (2 .10⁻³ mol.L⁻¹), 0,20 ml de ferrozina (5,0 .10⁻³ mol.L⁻¹) e 2,75 mL de água. A mistura foi agitada e incubada a temperatura ambiente durante 10 min. Foi medida a absorvância da mistura a 562 nm. A atividade quelante foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Atividade Quelante (\%)} = [1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100,$$

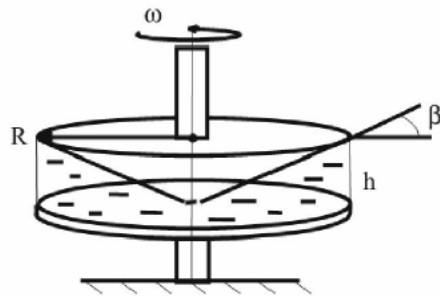
Onde A₀ é a absorção do branco, A₁ é a absorvância da solução a ser testada e A₂ é a absorvância de solução idêntica a A₁, com a substituição de FeCl₂ pela mesma alíquota de água. Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo.

4.7 Caracterização Reológica

Medidas reológicas foram realizadas em um reômetro rotacional (Ares, TA Instruments, New Castle, USA), usando a geometria cone-prato – Figura 11 - (50 mm de diâmetro, ângulo do cone medindo 0,0399 rad e lacuna de 0,0553 mm). Todas as medidas foram realizadas a 25 ± 1 °C.

Curvas de fluxo foram obtidas aumentando as taxas de 0,1 a 100 s⁻¹ com incremento de 4 s⁻¹ e, em seguida, na sequência inversa.

Figura 11. Sistema cone-prato.



Fonte: BRUMMER (2006).

Testes dinâmicos foram realizados para a avaliação do comportamento do módulo de armazenamento (G') e do módulo de perda G'' em função da frequência. As varreduras de frequência foram realizadas na região linear viscoelástica (RVL).

A fim de fazer comparações quanto a propriedades e possíveis aplicações, os testes reológicos também foram realizados com uma amostra de ágar comercial (Sigma Aldrich, USA) com propriedades de gel forte.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da composição centesimal

A composição centesimal tem por finalidade determinar componentes específicos de alimentos, tais como a umidade e teores de cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos. O teor de umidade relaciona-se com a estabilidade, a qualidade e a composição dos alimentos. As cinzas são consideradas como os resíduos inorgânicos que persistem no material em análise após a queima da matéria orgânica, que se converte em CO₂, H₂O e NO₂. As proteínas são grandes constituintes das células vivas e, nos alimentos, estão relacionados a propriedades organolépticas e de texturas. Os lipídeos são componentes insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, sendo seu teor bastante variável de acordo com o alimento analisado. Os carboidratos são abundantes e amplamente distribuídos nos alimentos, sua determinação é de grande importância, uma vez que aos carboidratos são atribuídas várias funções como: matéria-prima para produtos fermentados, ingrediente dos cereais, responsáveis pelas reações de oxidação dos alimentos e os principais responsáveis pelas propriedades reológicas, extensivamente estudadas no desenvolvimento de produtos industriais (CECCHI, 2007). Os valores obtidos, na análise centesimal da alga marinha *Gracilaria intermedia*, são similares aos encontrados em outras algas marinhas, conforme pode ser observado na **Tabela 01**.

Tabela 01. Composição centesimal de algas marinhas.

Alga Marinha	Umidade(%)	Lipídeos(%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Carboidratos(%)
Este estudo	13,96	0,44	12,32	15,42	57,86
<i>G.cervicornis</i> (a)	14,33	0,43	7,72	22,96	63,12
<i>S.vulgare</i> (a)	14,66	0,45	14,20	15,76	67,80
<i>G.turuturu</i> (b)	-	2,60	18,00	23,00	-
<i>S.filiformis</i> (c)	15,06	0,33	15,12	20,31	49,18
<i>H.musciformis</i> (c)	14,17	0,33	14,14	17,12	54,24

Fonte: (a) Marinho-Soriano, Fonseca, Carneiro, Moreira (2006). (b) Denis (2010). (c) Carneiro *et al.* (2012).

A umidade de 13,96 % encontrada para o material em estudo sugere que o processo de secagem da alga a 25 °C mostrou-se eficaz para que a mesma possa vir a ser estocada. Produtos que possuem um teor de umidade inferior a 30% atingiram uma zona de adsorção primária, a qual aponta para uma forte ligação da água ao material, que inviabiliza a proliferação de microorganismos (BULLERI, 2010).

A quantidade de lipídeos da alga *Gracilaria intermedia* é condizente com as encontradas em outras algas. Apesar da pequena quantidade de lipídios, estudos apontam que as gorduras encontradas em algas marinhas têm importante valor nutricional pela proporção de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados (TABARSA, REZAEI, RAMEZANPOUR, ROBERTWAALAND, 2012).

As cinzas das algas marinhas são majoritariamente compostas por cálcio, magnésio e iodo. Apesar de o iodo ser um importante elemento traço, sua excessiva quantidade em algumas espécies de algas oferece riscos à saúde de quem as consome (FLEURENCE *et al.* 2012).

O valor de proteínas que foi encontrado na alga marinha *Gracilaria intermedia* foi de 15,42 %. Este valor é menor que o apresentado por outras algas, conforme pode ser observado na **Tabela 01**. Entretanto, este percentual de proteínas é maior do que o teor de proteínas encontrado em alimentos de origem vegetal - arroz integral (7,5 a 9,0 %), arroz polido (5,2 a 7,6 %), farinha de trigo (9,8 a 13,5 %), milho (7,0 a 9,4 %), batata (10,0 a 13,0 %) - e mesmo alimentos de origem animal, como o leite integral (3,5 %) e o ovo (13,0 %) (CECCHI, 2007).

5.2 Rendimentos

Os rendimentos de polissacarídeos obtidos foram de 17,00% para a fração enzimática; 31,25% para a amostra nativa; 26,75% para a amostra obtida com NaOH 1%, a frio; 29,72% para a obtida por NaOH 5%, a frio; 39,61% para a amostra tratada com KOH 1%, a frio e 35,93% para a tratada com KOH 5%, a frio. O tratamento alcalino a quente não resultou em material gelificante e, dessa forma, foi descartado. Tais rendimentos situam-se entre valores obtidos em outras algas do gênero *Gracilaria*, conforme aponta a **Tabela 02**.

Tabela 02. Rendimento de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas do gênero *Gracilaria*.

Alga		Rendimento (%)
<i>Gracilaria birdiae</i>	(a)	6,50
<i>Gracilaria blodgettii</i>	(b)	26,20 - 37,00
<i>Gracilaria cervicornis</i>	(b)	39,30
<i>Gracilaria córnea</i>	(c)	21,40
<i>Gracilaria corticata</i>	(d)	21,80
<i>Gracilaria corticata</i>	(e)	9,50 – 16,00
<i>Gracilaria crassa</i>	(e)	12,00 – 23,00
<i>Gracilaria crassissima</i>	(b)	13,10 – 30,00
<i>Gracilaria edulis</i>	(f)	10,90
<i>Gracilaria fisheri</i>	(f)	13,30

Fonte: (a) Maciel *et al.*, 2008.

(b) Freile-Peigrín, Murano, 2005.

(c) Melo, Feitosa, Freitas, De Paula, 2002.

(d) Adriamanantoanina, Chambat, Rinaudo, 2007

(e) Meena, Prasad, Ganesan, Siddhanta, 2008.

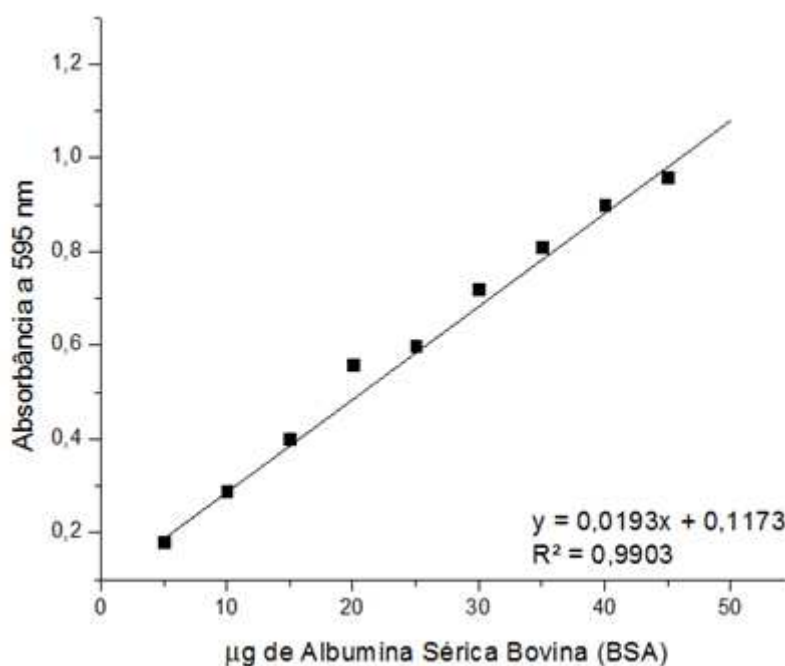
(f) Praiboon *et al.*, 2006.

A espécie de alga, a metodologia empregada para a extração de seus polissacarídeos, variações sazonais e mesmo o local de origem dos espécimes é determinante para o seu rendimento. As diferenças de rendimentos observadas na tabela devem estar relacionadas a algumas dessas variantes. E os resultados obtidos neste estudo mostram a influencia que diferentes metodologias de extração têm no rendimento dos materiais polissacarídicos obtidos.

5.3 Determinação de Proteínas

A curva de calibração obtida com o padrão albumina sérica bovina e o reagente de Bradford para a determinação da quantidade de proteínas presentes nas amostras pode ser observada na **Figura 12**.

Figura 12. Curva padrão para a estimativa da concentração de proteínas.

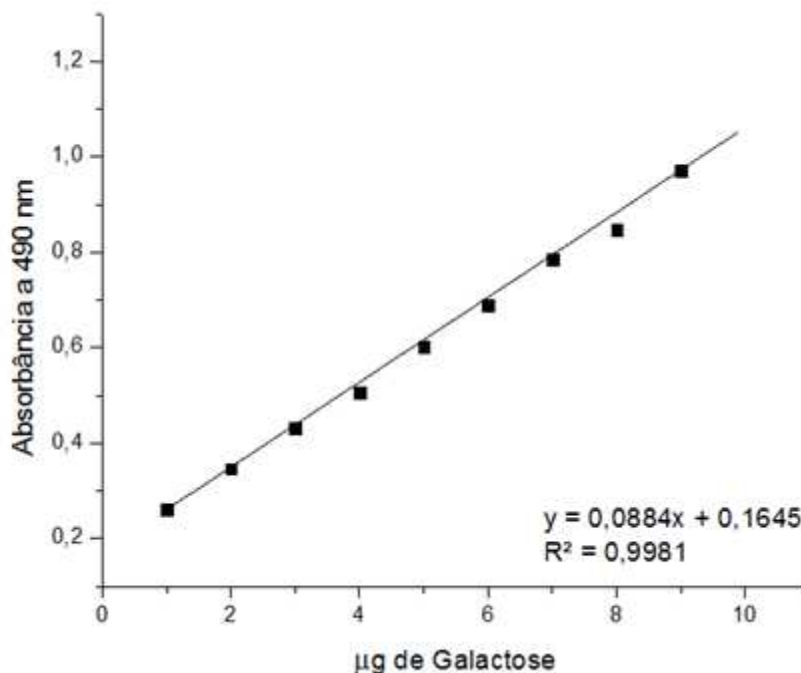


As leituras de absorbância das soluções contendo polissacarídeos de todas as extrações realizadas ficaram abaixo do poder de detecção do aparelho utilizado, o que demonstra que os materiais obtidos pelas extrações realizadas possuem apenas traços de proteínas.

5.4 Determinação de Carboidratos totais

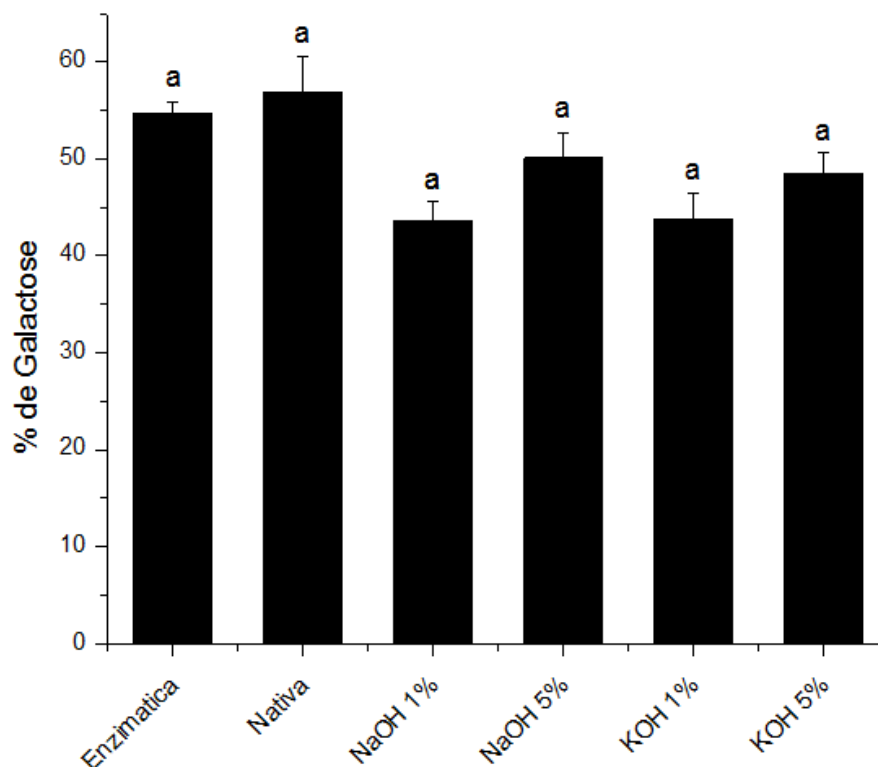
A curva de calibração obtida com o padrão galactose, para a determinação da quantidade de açúcares (galactose) presentes nas amostras pode ser observada na **Figura 13**.

Figura 13. Curva padrão que utilizou galactose para aplicação do método de Dubois.



A correlação dos valores encontrados nas soluções do polissacarídeo obtido da alga *Gracilaria intermedia* e a curva de calibração (**Figura 13**) apontam para as seguintes quantidades de galactose: enzimática ($54,64 \pm 1,19\%$), nativa ($56,87 \pm 3,72\%$), NaOH 1,0% ($43,57 \pm 2,00\%$), NaOH 5,0% ($50,08 \pm 2,66\%$), KOH 1,0% ($43,75 \pm 2,75\%$), KOH 5,0% ($48,50 \pm 2,13\%$). Os valores de galactose apresentados por cada uma das amostras polissacarídicas em estudo não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre si, conforme pode ser observado na **Figura 14**.

Figura 14. Determinação de Galactose pelo método Fenol-sulfúrico, com galactose como padrão. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

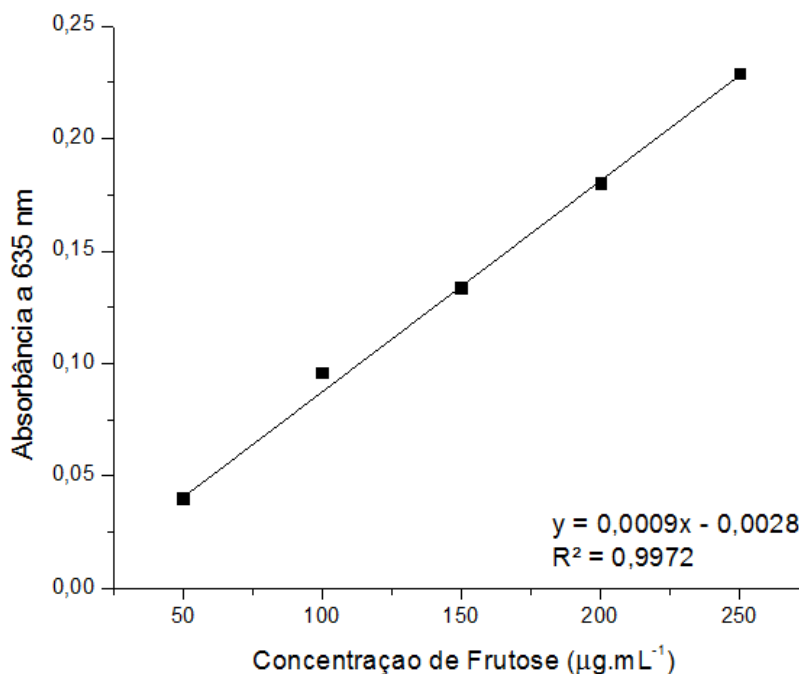


Os teores de carboidratos encontrados são condizentes com os percentuais de D-galactose encontrados em outras algas do gênero *Gracilaria*. Amorin *et al.*(2012) realizaram o teste fenol sulfúrico em diferentes frações de *Gracilaria ornata*, Brasil, e encontraram teores de açúcares variando entre 33,14 e 62,20%. Em frações polissacarídicas da alga *Gracilaria birdeae*, Brasil, foram encontrados teores de açúcares entre 30,8 e 68,2% (VANDERLEI *et al.*, 2011).

5.5 Quantificação de 3,6 anidrogactose

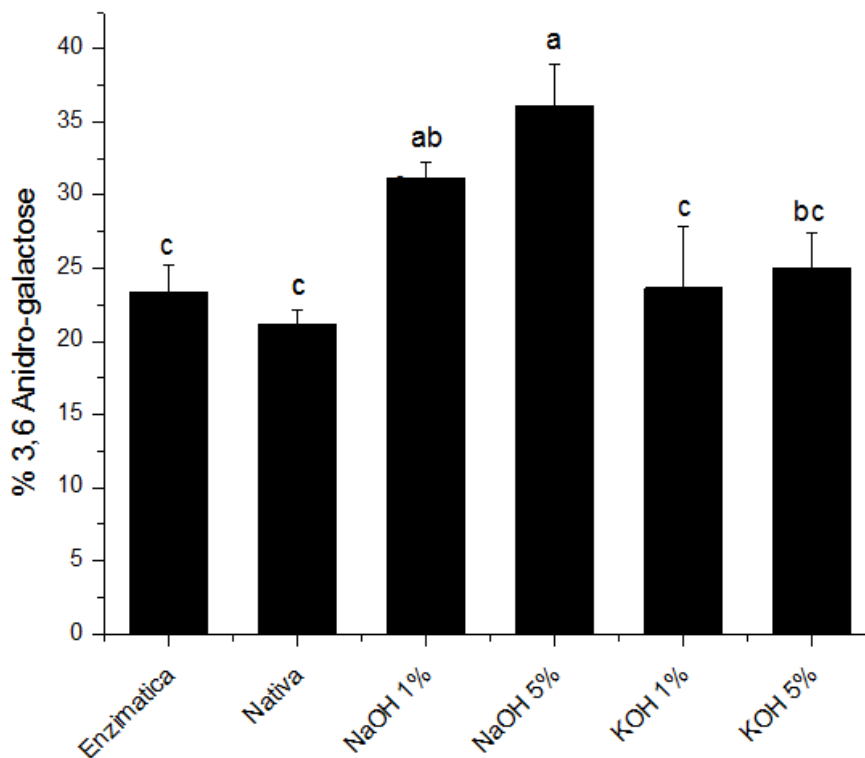
A curva de calibração obtida com o padrão frutose para a quantificação de 3,6 anidrogactose pode ser observada na **Figura 15**.

Figura 15. Curva padrão utilizando frutose para a determinação colorimétrica do teor de 3,6 anidrogalactose com leitura espectrofotométrica feita a 635 nm.



As correlações entre a curva padrão e soluções de polissacarídeo apontam que os materiais em estudo apresentam os seguintes percentuais de 3,6 anidrogalactose: enzimática ($23,34 \pm 1,92\%$), nativa ($21,12 \pm 1,03\%$), NaOH1% ($31,12 \pm 1,07\%$), NaOH 5% ($36,12 \pm 2,78\%$), KOH 1% ($23,62 \pm 4,19\%$), KOH 5% ($25,02 \pm 2,40\%$). O percentual de 3,6 anidrogalactose de cada uma das amostras em estudo é ilustrado na **Figura 16**. Considerando as diferenças estatisticamente significantes, é possível concluir que as amostras obtidas por meio de tratamento alcalino tiveram os valores de 3,6-anidrogalactose aumentados, quando se comparam estes materiais com a amostra obtida sem pré-tratamentos (nativa). O maior aumento de 3,6 anidrogalactose ocorreu na amostra obtida por pré-tratamento alcalino da alga com NaOH 5%.

Figura 16. Percentual de 3,6 anidrogactose quantificado nos produtos dos diferentes protocolos de extração de polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria intermedia*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



Os valores obtidos são condizentes com valores de 3,6 anidrogactose encontrados em outras algas do gênero *Gracilaria* submetidas a diferentes protocolos de extração, como sugere a Tabela 03.

Tabela 03. Quantidade de 3,6 anidrogactose encontrado em algas marinhas do gênero *Gracilaria*.

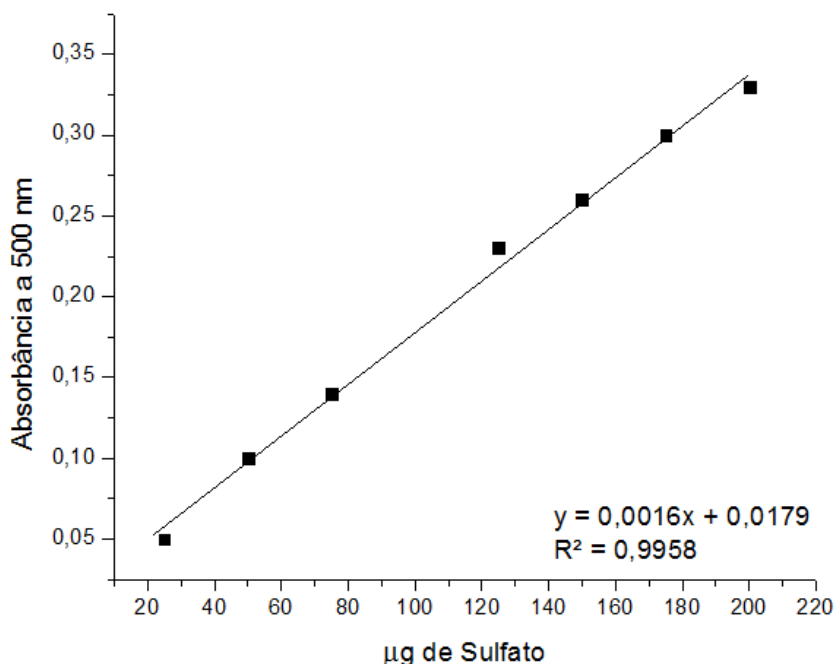
Alga		3,6 anidrogactose (%)
<i>Gracilaria eucheumoides</i>	(a)	26,00- 31,00
<i>Gracilaria cervicornis</i>	(b)	37,00
<i>Gracilaria blodgettii</i>	(b)	32,00-40,00
<i>Gracilaria crassissima</i>	(b)	35,00-43,00

Fonte: (a) Villanueva *et al.*, 1999. (b) Freile-Peigrín, Murano, 2005.

5.6 Determinação de sulfato

A curva de calibração obtida com o padrão sulfato de sódio anidro para a quantificação de sulfato livre é apresentada na **Figura 17**.

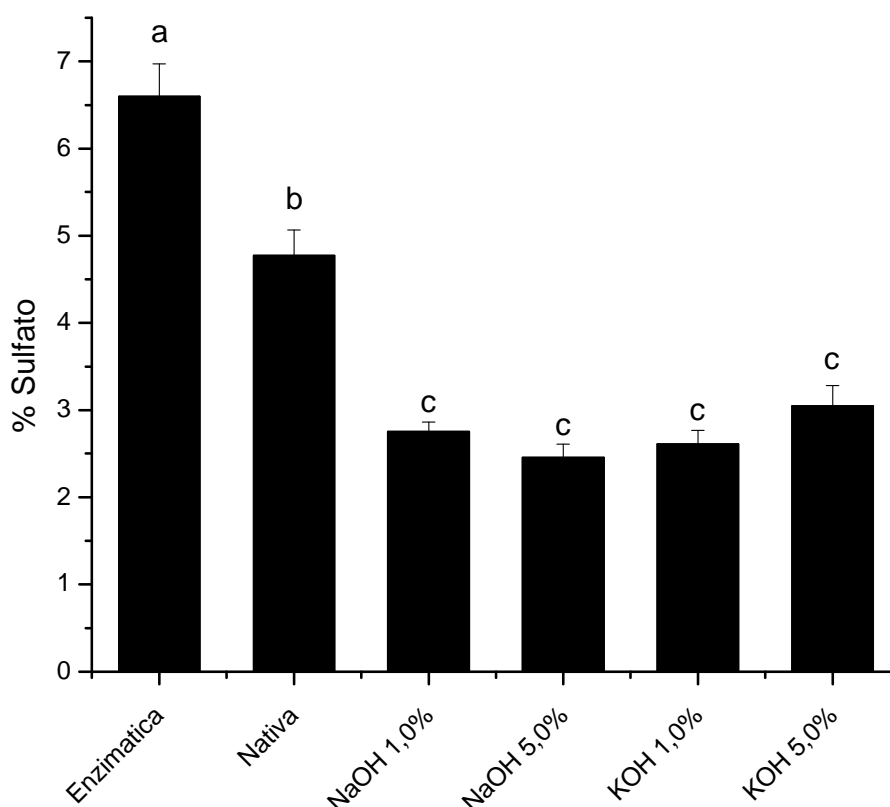
Figura 17. Curva padrão confeccionada com sulfato de sódio anidro para quantificação de sulfato livre.



As correlações entre a curva padrão e soluções de polissacarídeo apontam que os materiais em estudo apresentam os seguintes percentuais de sulfato: enzimática ($6,60 \pm 0,38\%$), nativa ($4,77 \pm 0,30\%$), NaOH 1,0% ($2,75 \pm 0,11\%$), NaOH 5,0% ($2,45 \pm 0,16\%$), KOH 1,0% ($2,61 \pm 0,15\%$) e KOH 5,0% ($3,05 \pm 0,24\%$). Tais valores, melhor observados na Figura 18, estão dentro no intervalo de 2,30 e 8,90%, apontado como a variação da quantidade de sulfato presente em polissacarídeos de algas do gênero *Gracilaria* (MACIEL *et al.* 2008). Estudos mais recentes, entretanto, apontam que tal intervalo deve ser ampliado, uma vez que foram encontrados percentuais de sulfato de $0,76 \pm 0,08\%$ em *Gracilaria debilis*,

Índia (MEHTA *et al.*, 2010), $1,00 \pm 0,05\%$ em *Gracilaria caudata*, Brasil (BARROS *et al.*, 2013) e $15,66\%$ em *Gracilaria cornea*, Brasil (COURA *et al.*, 2012). Outros estudos sugerem que o valor de sulfato livre encontrado no material em estudo é similar ao valor apresentado por outras algas do gênero *Gracilaria*, conforme indica a **Tabela 04**.

Figura 18. Ilustração do percentual de sulfato livre presente nas frações polissacarídicas obtidas a partir da alga vermelha *Gracilaria intermedia* por meio de diferentes protocolos de extração. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



O experimento de quantificação de sulfato apontam para a eficácia do tratamento enzimático em selecionar polissacarídeos sulfatados e também a redução estatisticamente significativa de sulfato nas amostras tratadas com NaOH e KOH. Estes resultados também corroboram com os valores encontrados quando realizados os testes que quantificaram 3,6 anidrogactose nas amostras:

amostras enzimática e nativa apresentaram quantidade de sulfato superior as encontradas nos materiais tratados com soluções alcalinas enquanto que estas têm os valores de 3,6 anidrogalactose superiores àquelas.

Tabela 04. Percentual de sulfato livre em espécies de algas do gênero *Gracilaria*

Alga	Fonte	Sulfato Livre (%)
<i>Gracilaria eucheumoides</i>	(a)	3,30-4,30
<i>Gracilaria cervicornis</i>	(b)	5,30-5,50
<i>Gracilaria blodgettii</i>	(b)	3,00-3,50
<i>Gracilaria crassissima</i>	(b)	1,50-4,30
<i>Gracilaria edulis</i>	(c)	1,30- 1,54
<i>Gracilaria crassa</i>	(c)	1,50-3,20
<i>Gracilaria folifera</i>	(c)	3,70-4,70
<i>Gracilaria corticata</i>	(c)	4,20-6,80

Fonte: (a) Villanueva *et al.*, 1999. (b) Freile-Pelegri, Murano, 2005. (c) Meena, Prasad, Ganesan, Siddhanta, 2008.

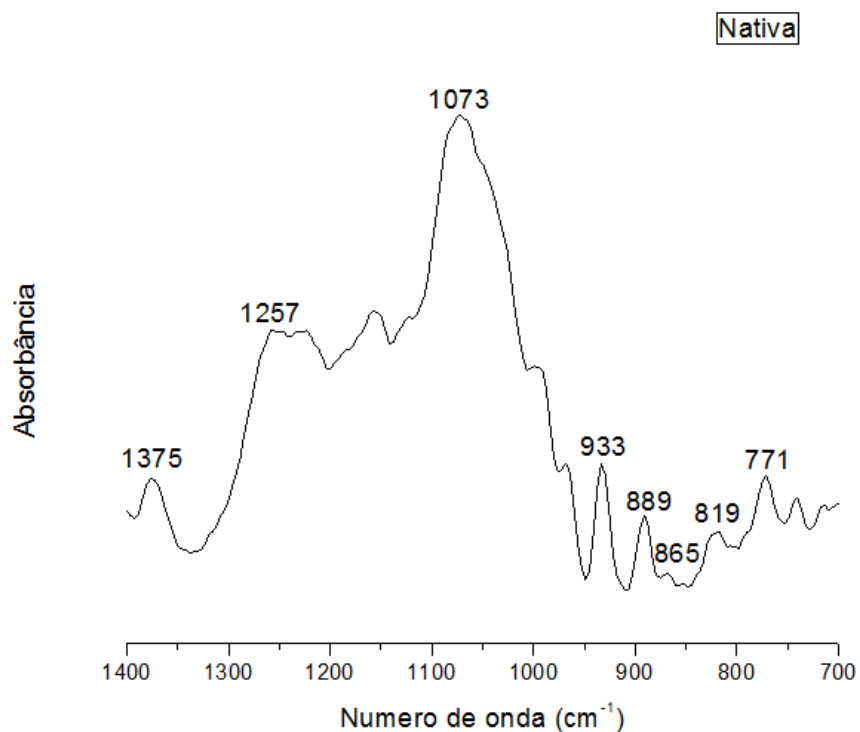
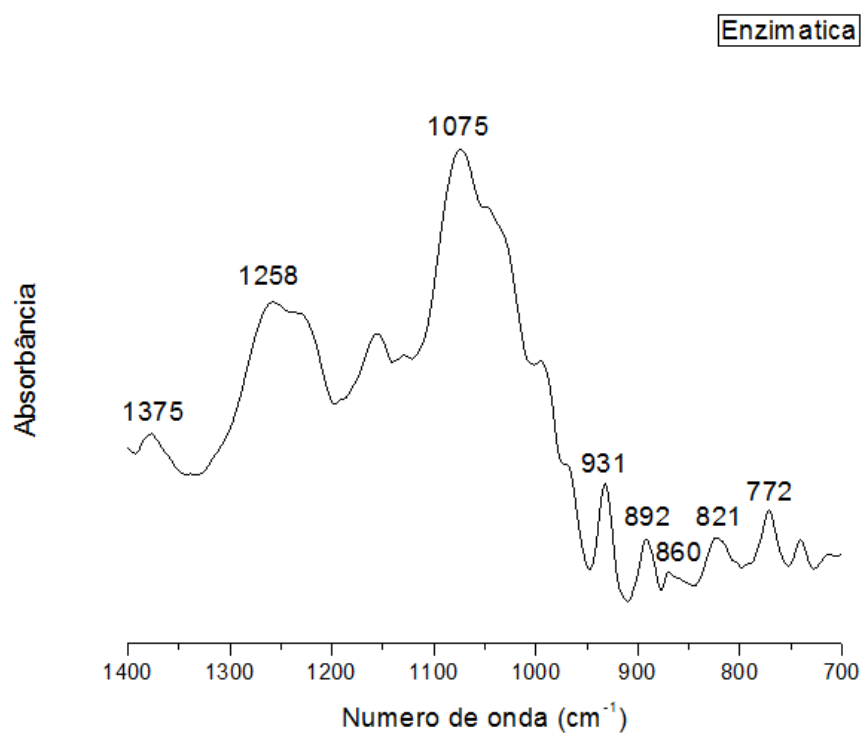
5.7 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

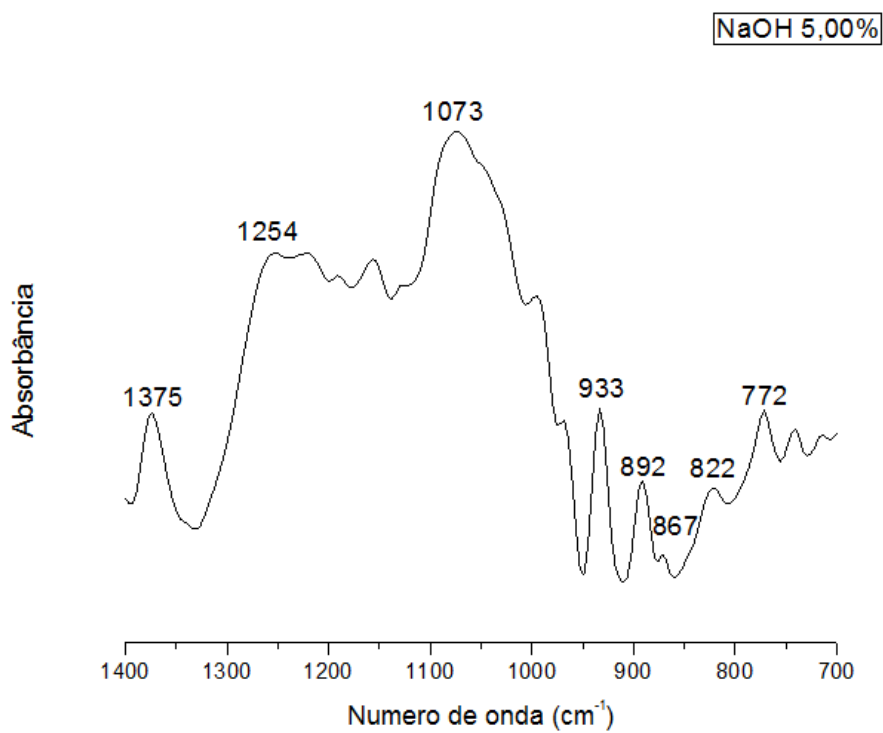
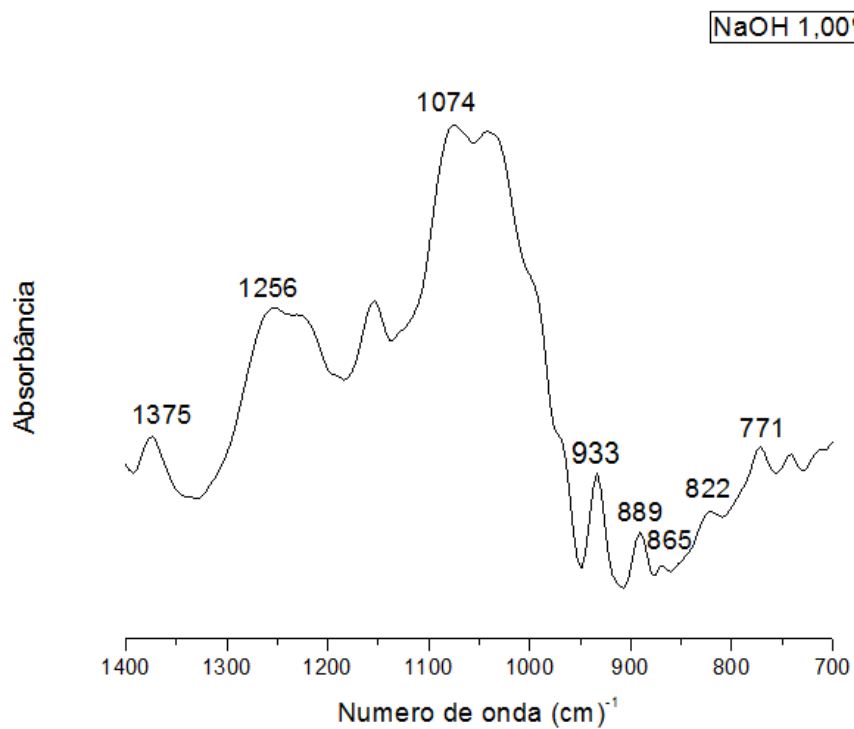
A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é uma técnica bastante útil para a elucidação de estruturas de compostos químicos. Os espectros de infravermelho dos materiais em estudo apresentam perfis de bandas semelhantes as que são relacionadas aos polissacarídeos de algas.

A **Figura 19** mostra os espectros na região do infravermelho das frações polissacarídicas em estudo expandido na região entre 1400 e 700 cm^{-1} para identificar melhor as bandas dos grupos sulfatados presentes. A **Tabela 05** indica as atribuições dadas aos picos obtidos. As bandas encontradas em 1375 - 1372 e 1258 - 1254 cm^{-1} podem ser atribuídas aos grupos ester sulfato (PRADO-FERNÁNDEZ, RODRÍGUES-VÁZQUEZ, TOJO, ANDRADE, 2003; ROCHAS, LAHAYE, YAPHE, 1986). A banda encontrada em 1075 – 1071 cm^{-1} refere-se aos esqueletos de galactanas (MOLLET, RAHAOUI, LEMOINE, 1998; PRADO-FERNÁNDEZ,

RODRÍGUES-VÁZQUEZ, TOJO, ANDRADE, 2003), e a banda encontrada a 892 - 888 cm^{-1} corresponde à banda específica de ágar (MOLLET, RAHAOUI, LEMOINE, 1998). A banda em 931 - 933 cm^{-1} refere-se ao grupo C-O-O presente no 3,6-anidrogactose, e a encontrada em 819 - 822 e 860 - 867 cm^{-1} indica a presença de grupos sulfatados (CHOPIN, WHALEN, 1993; MOLLET, RAHAOUI, LEMOINE, 1998; PAREKH, DOSHI, RAO, CHAUHAN, 1987, PRADO-FERNÁNDEZ, RODRÍGUES-VÁZQUEZ, TOJO, ANDRADE, 2003; ROCHAS, LAHAYE, YAPHE, 1986).

Figura 19. Espectros FT-IV em pastilhas de KBr dos Polissacarídeos de *Gracilaria intermedia* na região de número de onda de 1400 – 700 cm^{-1} .





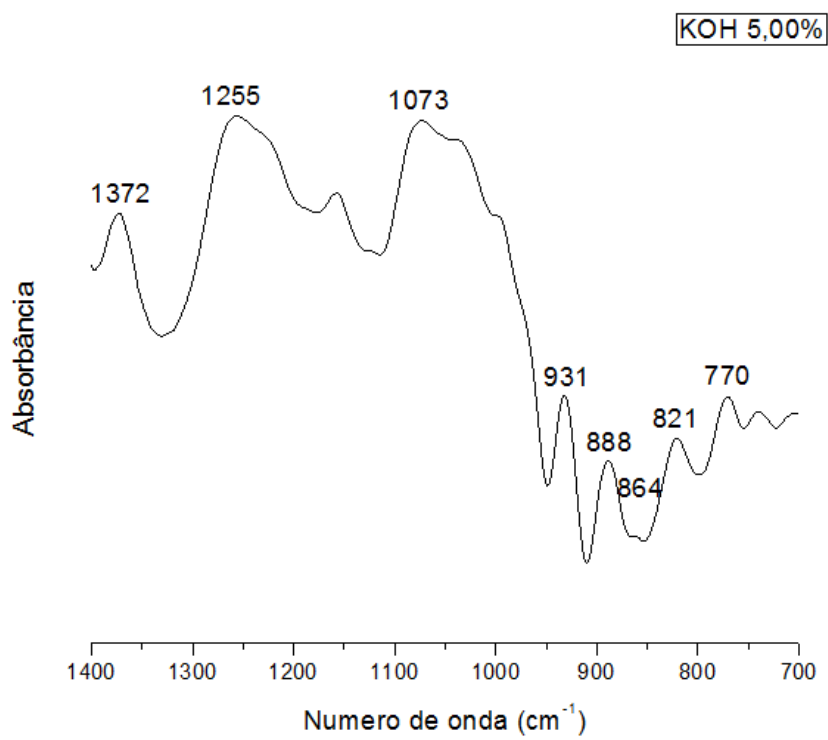
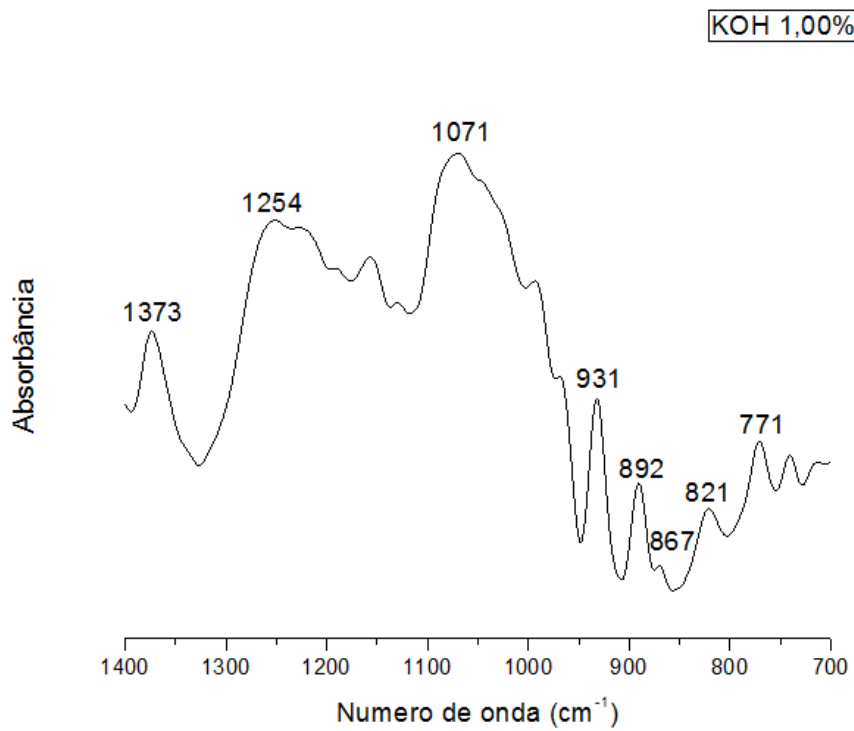


Tabela 05. Atribuições aos picos obtidos em experimentos de infravermelho.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições	Referência
1380 – 1355	Éster Sulfato	ab
1250 – 1240	O = S = O (estiramento assimétrico)	abc
1080 – 1040	Esqueleto de galactanas (C - O + C – OH)	ad
930	C – O – C de 3,6-anidrogactose	abc
900 – 890	Banda específica do ágar	d
850	Galactose-4-sulfato	e
820 – 810	Galactose-6-sulfato	abc
805 – 800	3,6-anidrogactose-2-sulfato	bc

Fonte: (a) PRADO-FERNADÉS *et al.*,2003. (b) ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986. (c) CHOPIN; HALEN, 1993. (d) MOLLET; RAHAOUI, LEMOINE, 1998. (e) CHOPIN ; KERIN ; MEZEROLLE, 1999.

5.8 Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) resultaram em espectros possíveis de análise apenas para a amostra enzimática, possivelmente pela sua menor viscosidade frente às demais amostras em estudo.

A **Figura 20A** mostra os sinais do próton anomérico - α em δ 5,14 ppm atribuído a 3,6 α -L-anidrogactose. O H-1 de β -D-galactose ligada a 3,6 α -L-anidrogactose foi o sinal de δ 4,60 ppm, e o H-1 ligada a α -L-galactose-6-sulfato foi o sinal de δ 4,44 ppm (MAZUMDER *et al.*, 2002).

A **Figura 20B** mostra os sinais em δ 103,5 ppm, 102,5 ppm, 101,1 ppm, e 98,5 ppm, o que corresponde a carbonos anoméricos de C-1 de β -D-galactose, ligadas ao α -L-galactose 6-sulfato, o C-1 da β -D- galactose ligada a 3,6 α -L-anidrogactose, C-1 de α -L-galactopiranosose unidade 6-sulfato, e C-1 de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, respectivamente (USOV, YAROTSKY, SHASHKOV, 1980; VALIENTE *et al.*, 1992). Os sinais atribuídos ao CH2 são observados em δ 69,4 ppm para 3,6 α -L-anidrogactose, em δ 67,4 ppm para α -L-galactose-6-sulfato, em δ 61,6 ppm por β -D-galactose ligada a α -L-galactose, 6-sulfato, e de 61,3 ppm para δ β -D-

galactose ligada a 3,6 α -L-anidrogactose (MACIEL *et al.*, 2008). Semelhante a Maciel e colaboradores (2008), não há evidências de um sinal S-CH₃ (δ 59) espectro, indicando a ausência de uma quantidade significativa do resíduo -O-metil- nesta amostra.

A **Tabela 06** indica as atribuições dadas aos sinais obtidos.

Figura 20. Espectro de RMN de polissacarídeos extraídos de forma enzimática da alga vermelha *Gracilaria intermedia* em solução de D₂O. (A) ¹H RMN (B) ¹³C RMN

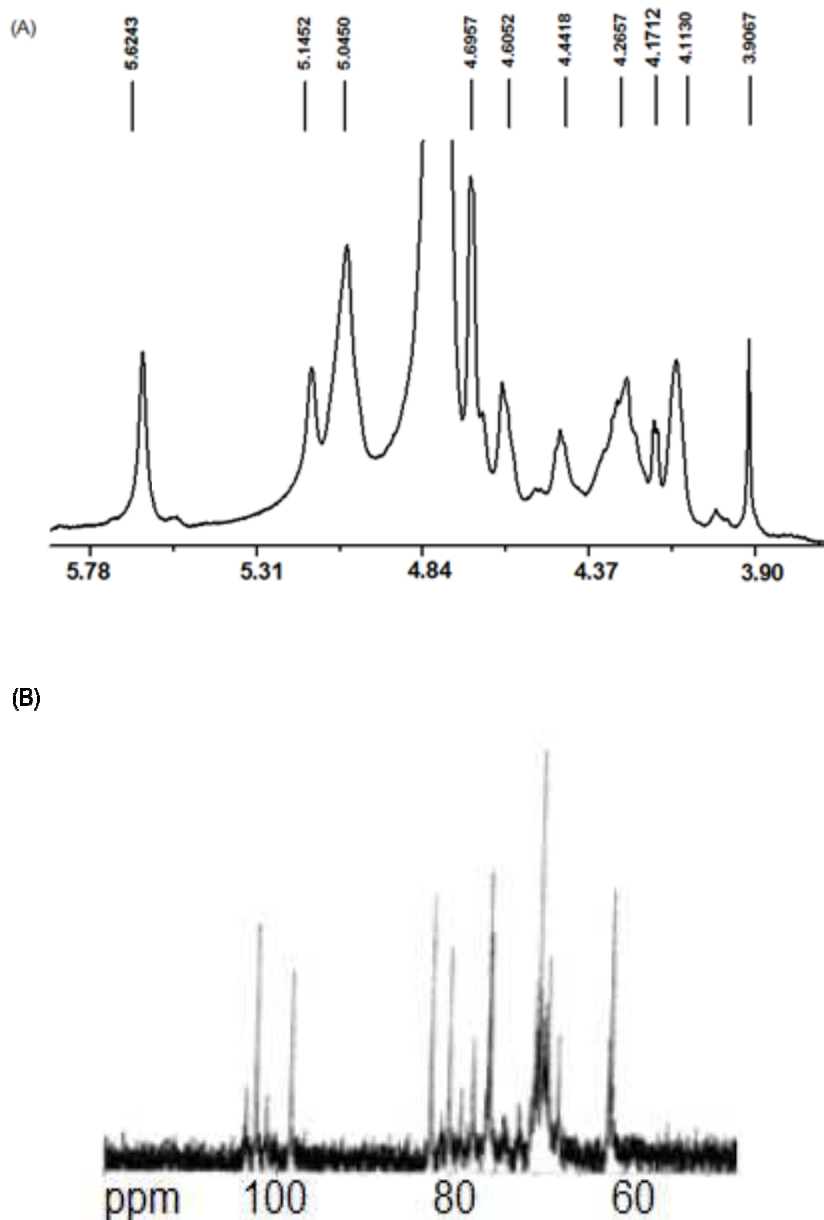


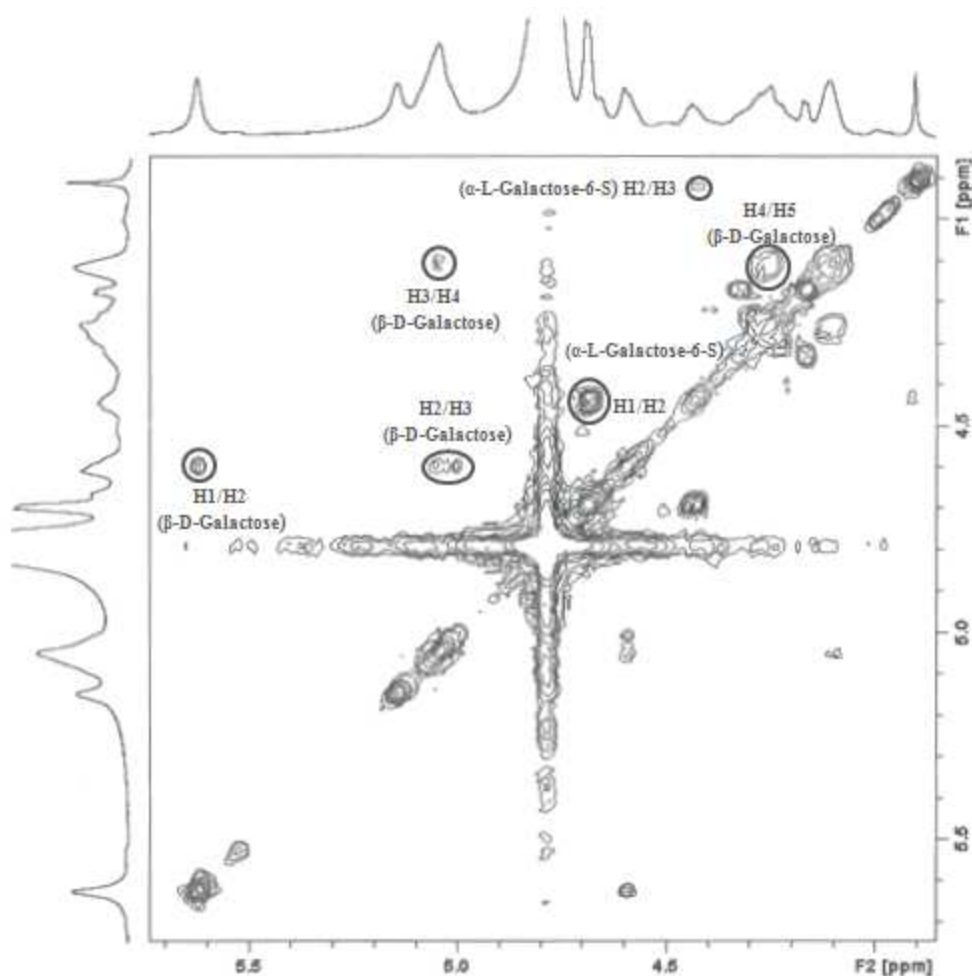
Tabela 06. Atribuições aos sinais obtidos em experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

δ (ppm)	Atribuições	Referência
5,14	Próton anomérico - α 3,6 α -L-anidrogactose	a
4,60	H-1 de β -D-galactose ligada a 3,6 α -L-anidrogactose	a
4,44	H-1 ligada a α -L-galactose-6-sulfato	a
103,5	C anomérico de β -D-galactose ligadas ao α -L-galactose 6-sulfato	bc
102,5	C anomérico da β -D- galactose ligada a 3,6 α -L- anidrogactose	bc
101,1	C anomérico de α -L-galactopiranosose unidade 6-sulfato	bc
98,5	C anomérico de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose	bc

Fonte: (a) MAZUMDER *et al.*, 2002. (b) USOV, YAROTSKY, SHASHKOV, 1980; (c) VALIENTE *et al.*, 1992.

O COSY 2D foi usado para determinar a ressonância da sequencia de prótons (Figura 21). Os prótons que são acoplados são, respectivamente, H-1 (β -D-galactose)/ H-2 (β -D-galactose) em δ 5,62/4,60, H-2 (β -D-galactose)/ H-3 (β -D-galactose) em δ 4,60/5,40, H-3 (β -D-galactose)/ H-4 (β -D-galactose) em δ 5,40/4,11, H-4 (β -D-galactose)/ H-5 (β -D-galactose) em δ 4,11/4,26 H-1 (α -L-galactose-6-sulfato)/ H-2 (α -L-galactose-6-sulfato) em δ 4,69/4,44 e H-2 (α -L-galactose-6-sulfato)/ H-3 (α -L-galactose-6-sulfato) em δ 4,44/3,90 .

Figura 21. Espectro de COSY de Polissacarídeos de *Gracilaria intermedia* (extração enzimática) em D₂O. Nesta figura, o termo α -L-galactose-6-S se refere a α -L-galactose-6-sulfato.

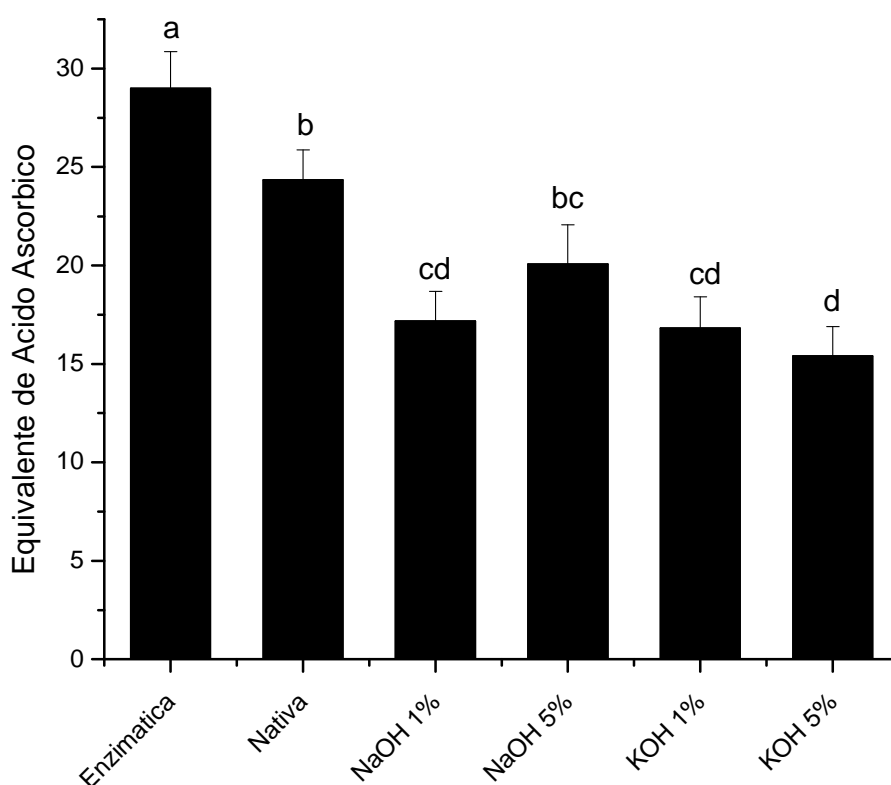


5.9 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante total de um composto é determinada pela formação do complexo fosfomolibdênio quando Mo^{6+} é reduzido a Mo^{5+} . Os polissacarídeos obtidos da alga vermelha *Gracilaria intermedia* por diferentes protocolos de extração apresentaram atividade de formação do complexo fosfomolibdênio, e cada uma dessas concentrações mostrou as seguintes equivalências de ácido ascórbico: Enzimática ($28,98 \pm 1,86$), Nativa ($24,34 \pm 1,52$), NaOH 1% ($17,16 \pm 1,51$), NaOH 5% ($20,07 \pm 1,96$), KOH 1% ($16,82 \pm 1,58$), KOH 5% ($15,40 \pm 1,48$). Tais valores de equivalência apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, conforme é observado na **Figura 22**.

Observa-se ainda que a maior atividade antioxidante total é apresentada pela amostra obtida de maneira enzimática, a qual apresenta quantidade de sulfato superior às demais amostras; esta observação é condizentes com dados obtidos na literatura que correlacionam significativas propriedades antioxidantes aos polissacarídeos sulfatados (YE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010; BARAHONA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2012; VIJAYABASKAR; VASEELA; THIRUMARAN, 2012).

Figura 22. Capacidade antioxidante total de polissacarídeos de *Gracilaria intermedia*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

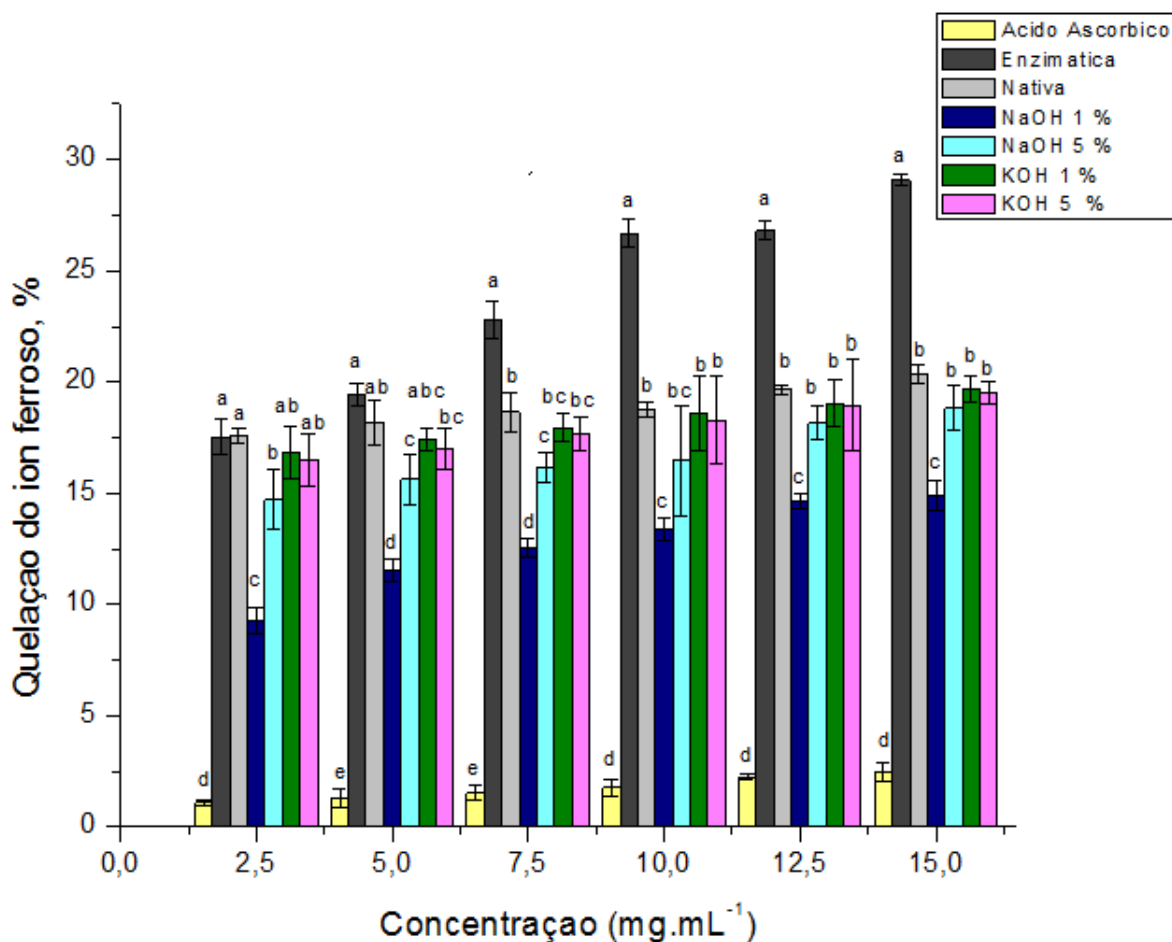


O íon ferro é associado com a peroxidação lipídica que ocorre segundo a reação de Fenton. Processo este que está relacionado a uma série de doenças (ZHANG, WANG, ZHANG, ZHAO, 2011; CHUN-HUI, CHANG-HAI, ZHI-LIANG, YI, 2007; QI *et al.*, 2005), e os compostos antioxidantes formam um complexo com este

íon, prevenindo, dessa forma, os danos às células (MOURANDI-GIVERNAUD *et al.*, 2013).

O polissacarídeo de *Gracilaria intermedia* apresentou habilidade de quelar íons ferro (II) de maneira dose-dependente e apresentaram atividade significativamente maior que a exibida pelo ácido ascórbico (**Figura 23**), usado como controle positivo.

Figura 23. Percentual de quelação do íon ferroso apresentada pelos polissacarídeos de *Gracilaria intermedia* e atividade exibida por ácido ascórbico. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para cada uma das concentrações testadas.



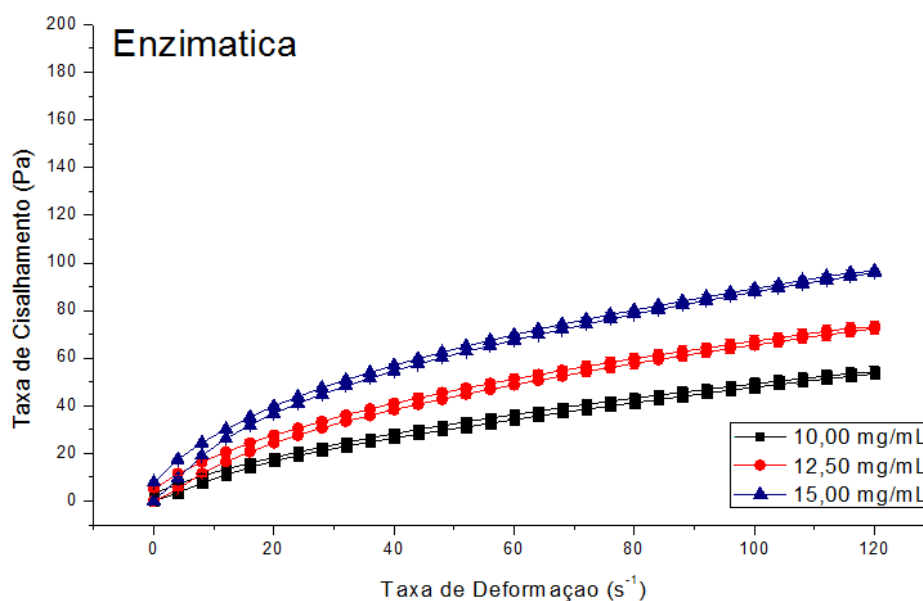
Os resultados apresentados, no teste de capacidade antioxidante total e no teste de quelação do íon ferroso, também mostram que os polissacarídeos com a maior quantidade de sulfato são os que apresentam uma maior capacidade antioxidante.

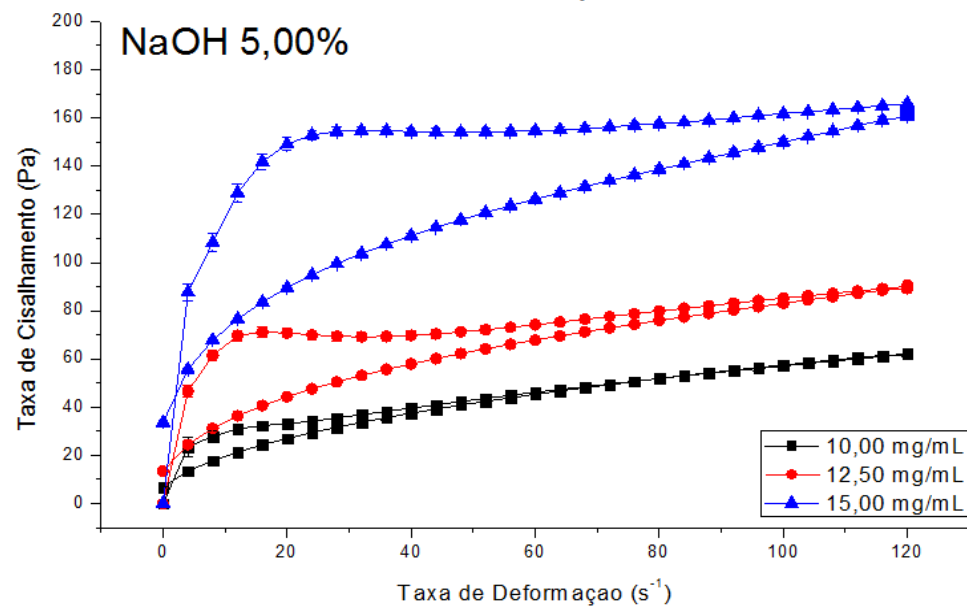
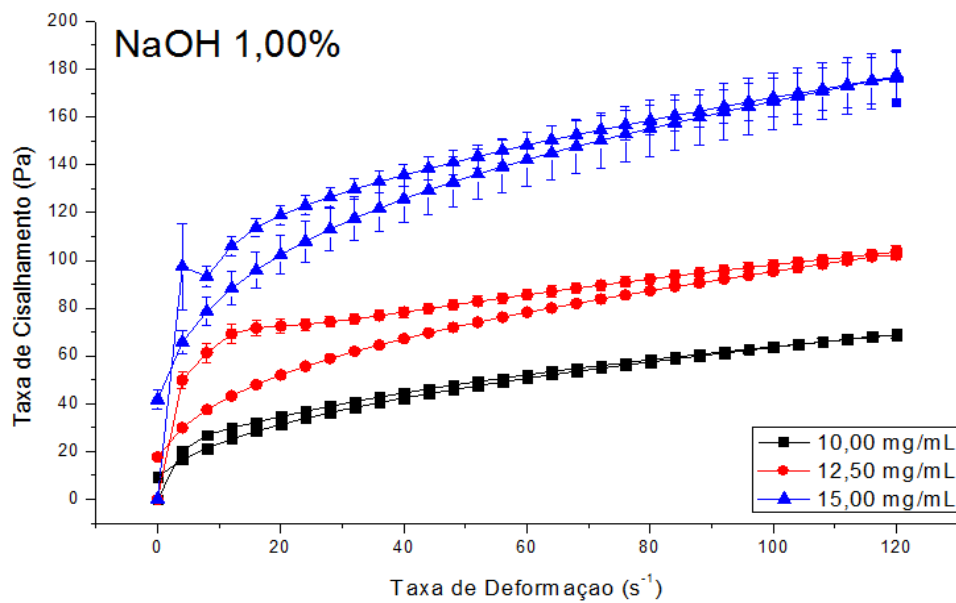
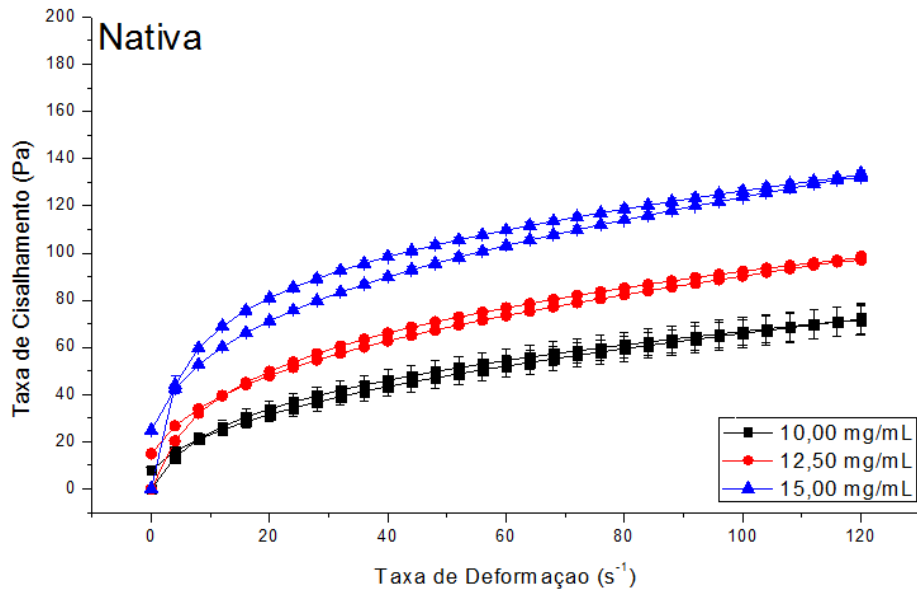
A partir dos resultados dos dois testes que avaliaram a capacidade antioxidante, é possível concluir que nos polissacarídeos extraídos da alga marinha *Gracilaria intermedia*, a capacidade antioxidante está diretamente relacionada à quantidade de sulfato contida na amostra.

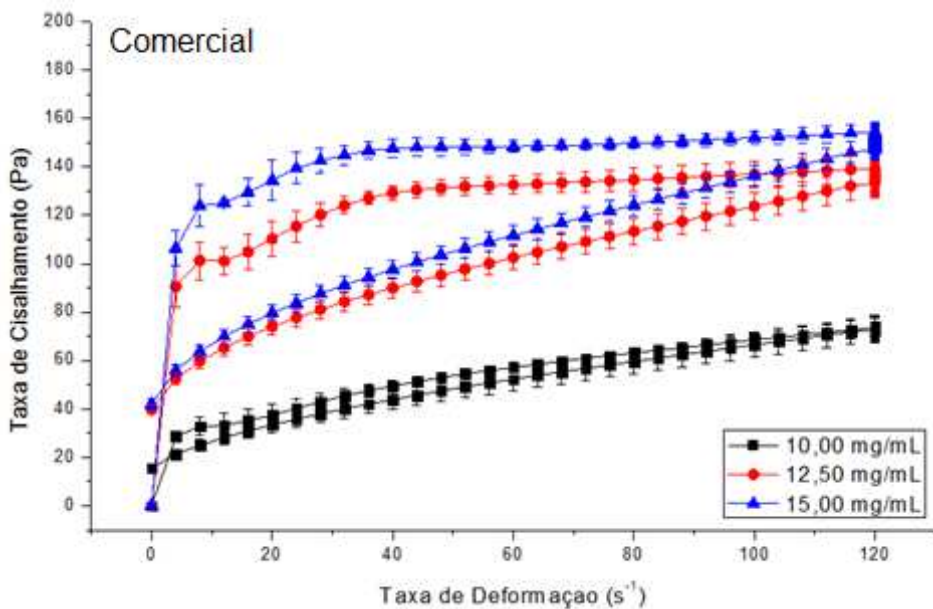
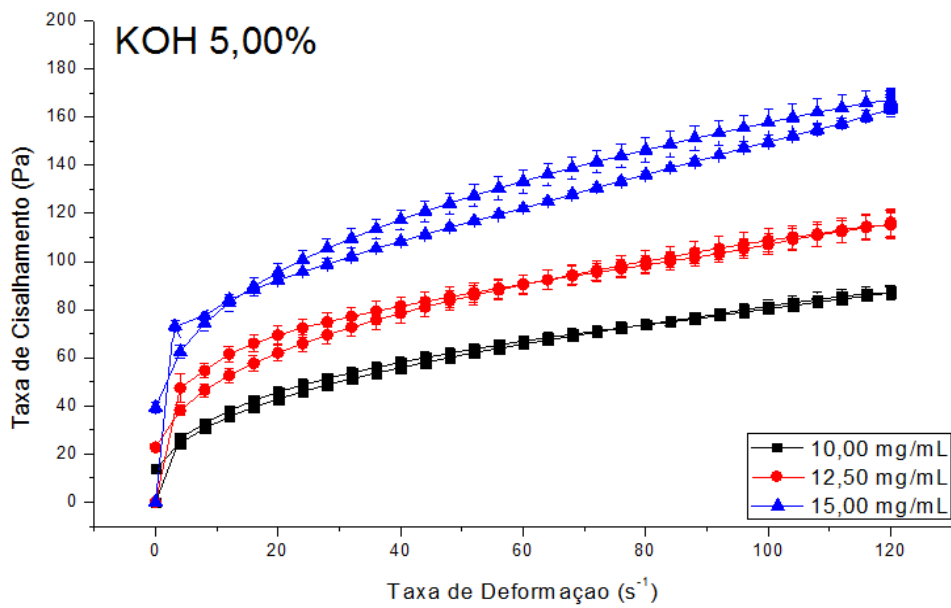
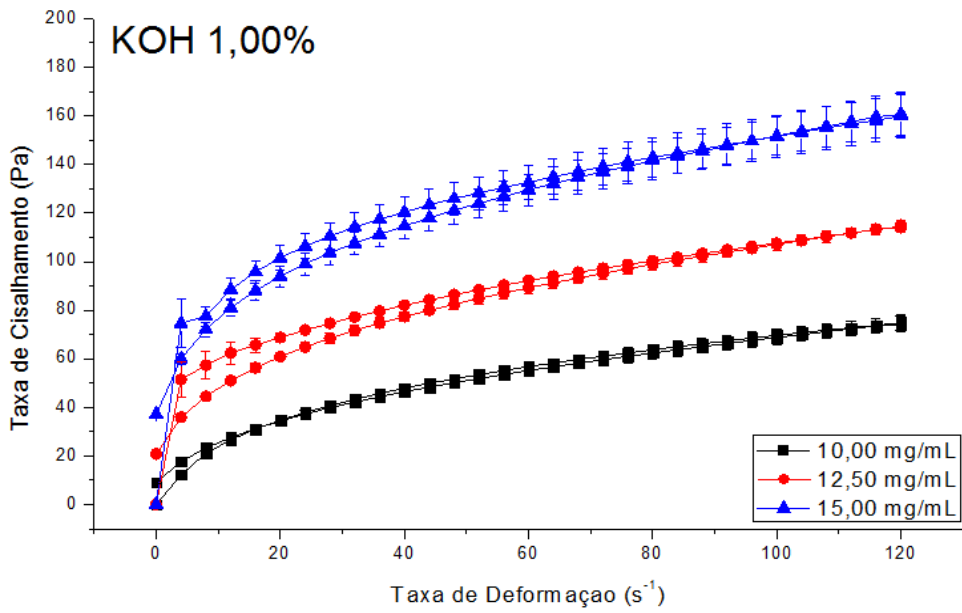
5.10 Comportamento Reológico

A **Figura 24** mostra os gráficos obtidos nos experimentos que relacionam taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento das amostras em estudo. As curvas ascendentes e descendentes de tais experimentos delimitam as denominadas áreas de histerese, que são diretamente proporcionais à quantidade de energia necessária para a quebra da estrutura tixotrópica das moléculas em solução (SCHRAMM, 2006). As áreas de histerese obtidas foram pouco consideráveis, exceto nos gráficos relativos às amostras obtidas pelo tratamento com solução de NaOH 5% e na amostra comercial, conforme pode ser observado na Tabela 06.

Figura 24. Gráficos que relacionam taxa de cisalhamento vs. taxa de deformação das amostras em estudo. Estudo realizado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.







As áreas de histerese obtidas a partir de cada uma das amostras estudadas, nas diferentes concentrações, podem ser observadas na **Tabela 07**.

Tabela 07. Áreas de histerese obtidas a partir dos gráficos de Taxa de cisalhamento x taxa de deformação das amostras em estudo.

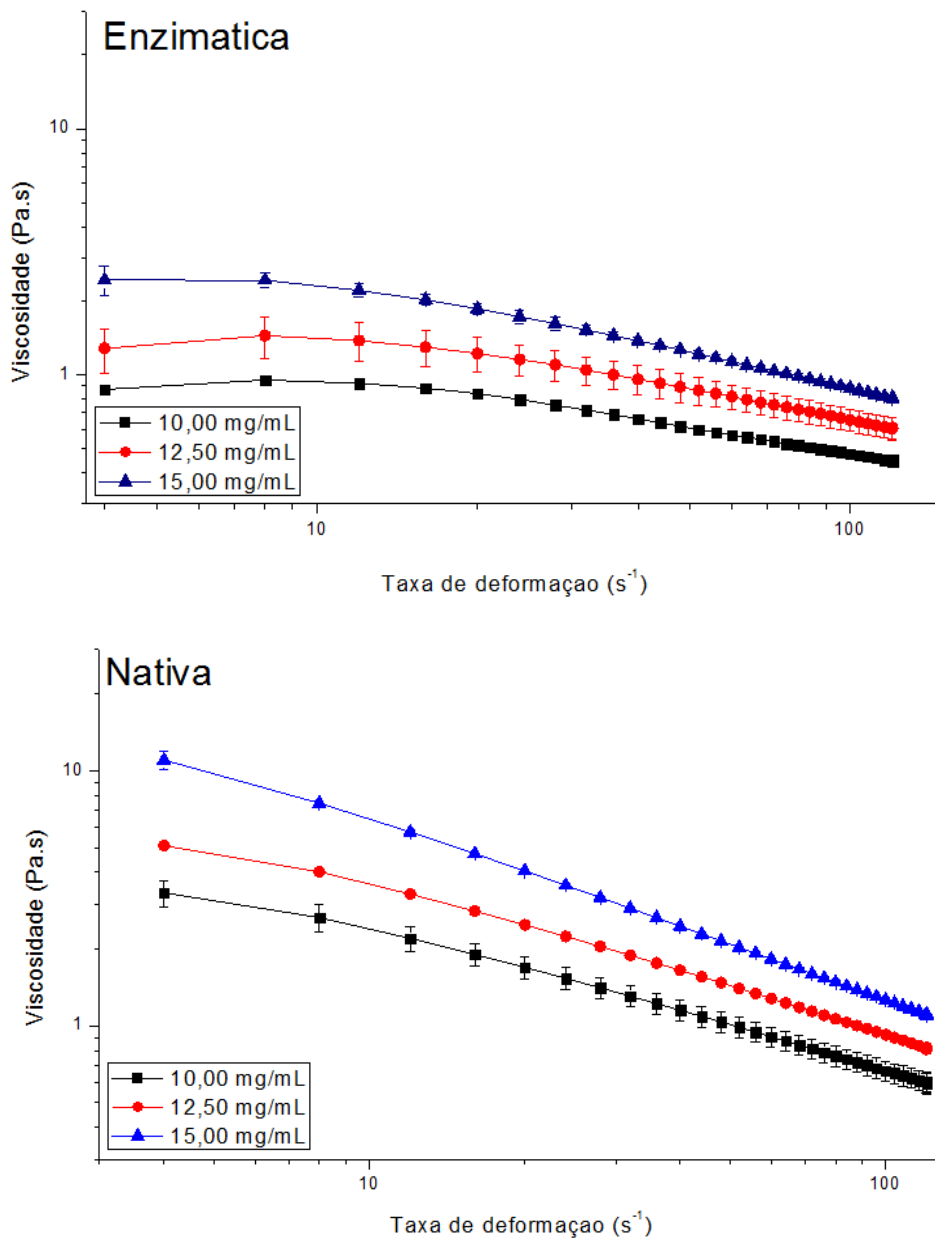
Concentração	Enzimática	Nativa	NaOH 1%	NaOH 5%	KOH 1%	KOH 5%	Comercial
10,00 mg/mL	225,71	171,93	182,55	246,85	61,75	80,70	448,79
12,50 mg/mL	301,73	203,13	1095,32	1211,25	430,95	172,83	3113,66
15,00 mg/mL	308,88	629,36	851,97	3473,42	349,09	190,32	4102,69

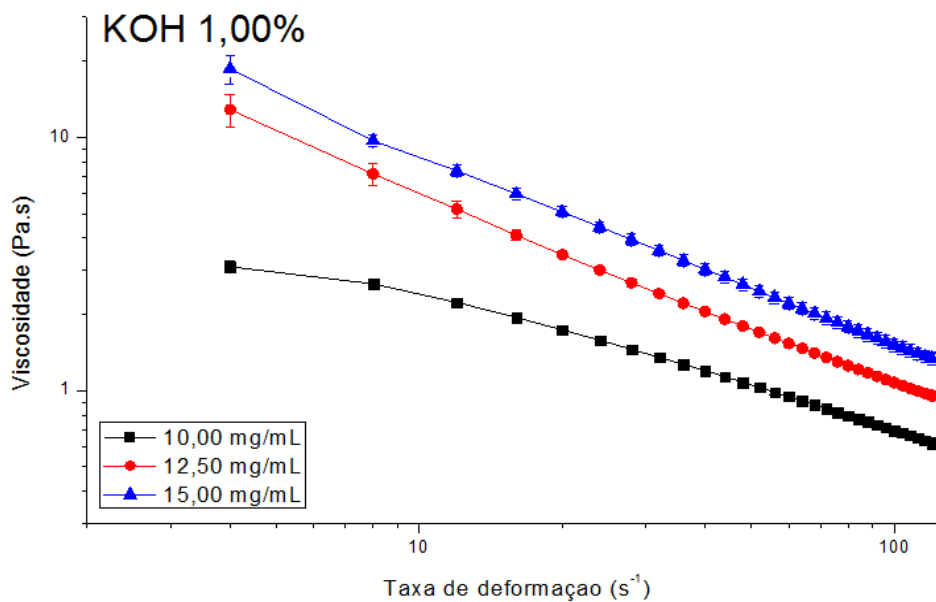
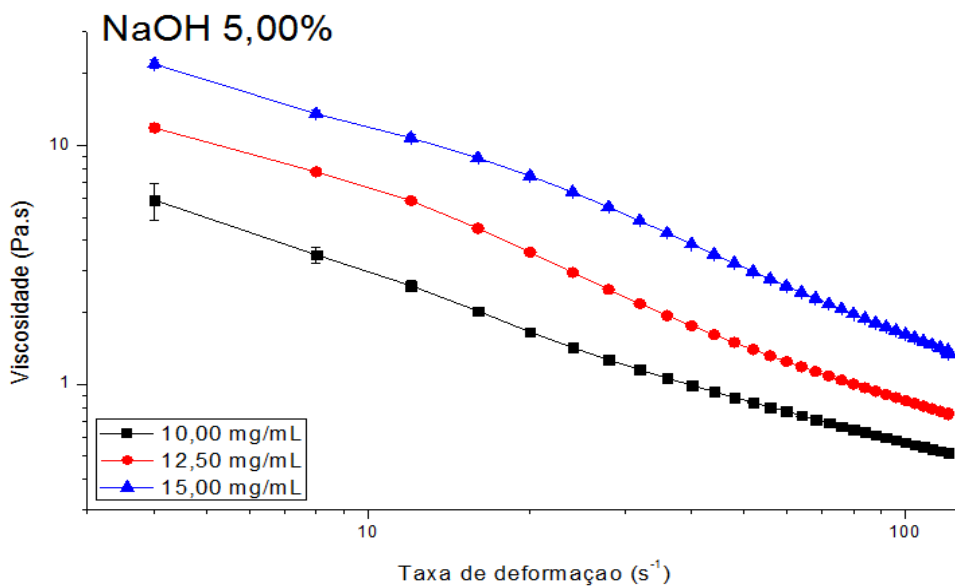
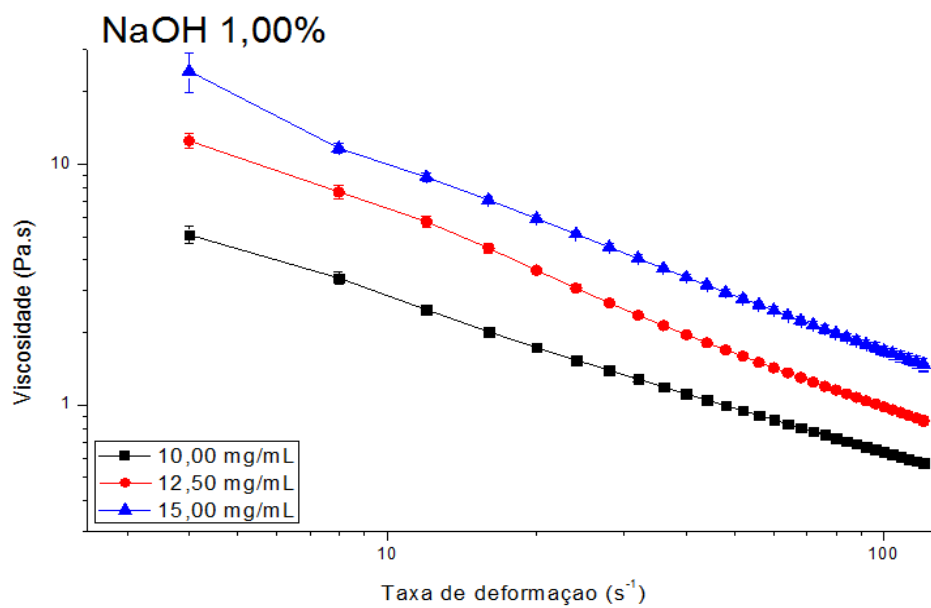
A energia requerida para a quebra da estrutura tixotrópica da amostra polissacarídica obtida com pré-tratamento alcalino a frio com NaOH 5 % é similar à necessária para a quebra da amostra comercial, sobretudo na concentração de 1,5 %, o que aponta para a similaridades na estruturação desses dois materiais na referida concentração.

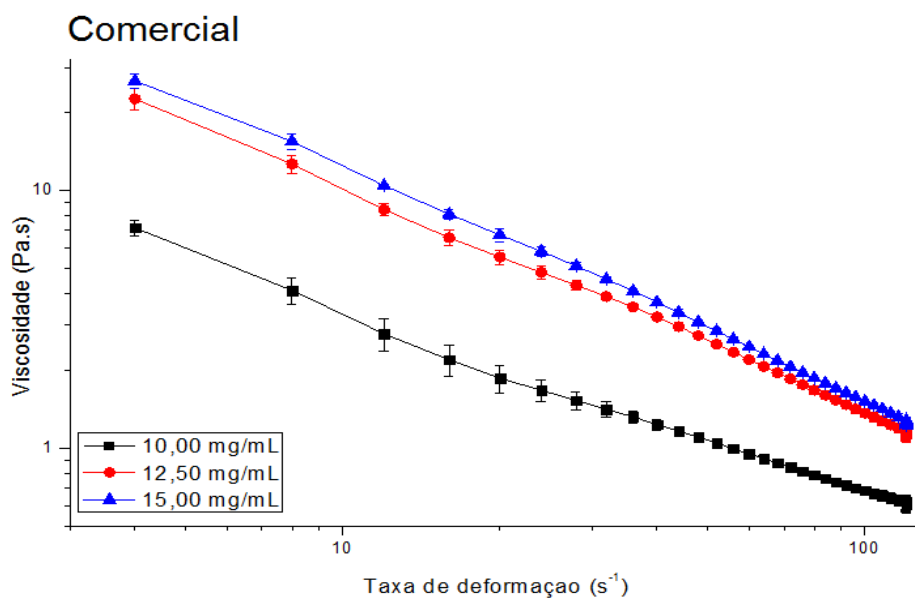
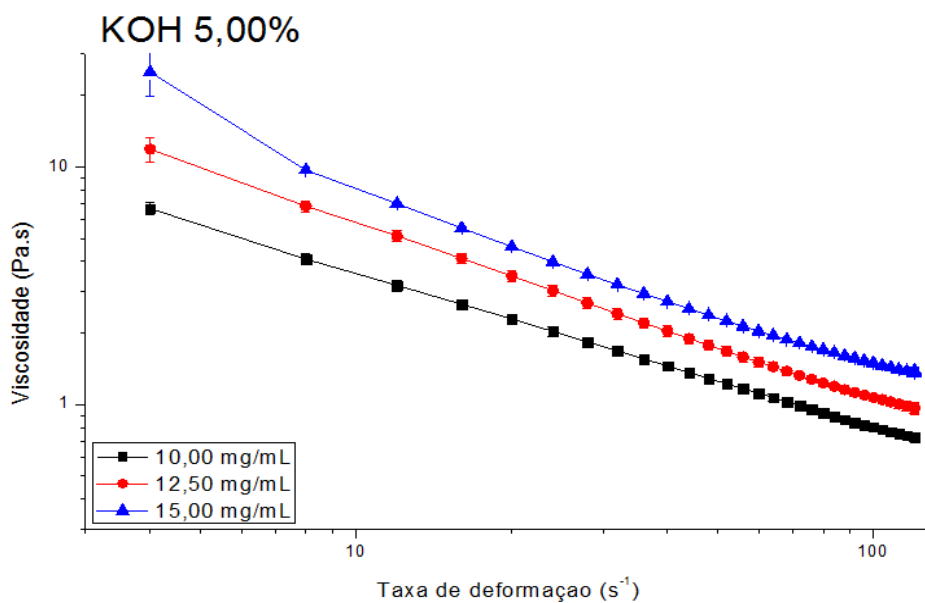
Um importante parâmetro reológico é a viscosidade, propriedade física que um líquido tem de resistir ao fluxo induzido pela tensão aplicada (cisalhamento). A viscosidade é dependente da natureza físico-química da substância, da temperatura, da pressão, da taxa de cisalhamento e do tempo (SCHRAMM, 2006). A **Figura 25** mostra o efeito das concentrações de polissacarídeo, em solução aquosa, (10,0 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹ e 15,0 mg.mL⁻¹) nas curvas de viscosidade a uma temperatura de 25 ± 1 °C. Um comportamento pseudoplástico é observado em todas as concentrações e amostras testadas, sendo a diminuição das viscosidades das amostras atribuídas a prováveis rompimentos das duplas hélices existentes na estrutura do ágar (GRANT *et al.* 2012), rompimentos estes que passam a ocorrer somente a partir de um determinado valor de tensão (t_{crit}). A amostra enzimática foi a que apresentou a menor viscosidade em todas as concentrações testadas, fato que deve estar relacionado a sua quantidade de sulfato, superior à apresentada pelas outras amostras. A força do gel formado por ágar é inversamente proporcional à quantidade de sulfato presente em sua estrutura (COSSON, DESLANDES, ZINOUN,

MOURANDI-GIVERNAUD, 1995). As amostras que tiveram pré-tratamento alcalino, e menos quantidade de sulfato quando comparadas às amostras enzimática e nativa apresentaram viscosidade superior estas e inferior à amostra comercial testada.

Figura 25. Variação da viscosidade conforme taxa de deformação aplicada a soluções de polissacarídicas de *Gracilaria intermedia* em diferentes concentrações. Estudo realizado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.







O índice de lei da potência (n), que indica o quão rapidamente a viscosidade diminui com as tensões aplicadas, apresentado por cada uma das concentrações testadas está representado na **Tabela 08**. Os resultados foram obtidos pelos cálculos das tangentes das curvas de fluxo. Os valores encontrados, estão situados entre 0 e 1, o que evidencia o comportamento pseudoplástico de todos os materiais testados (BOLMSTEDT, 2000).

Tabela 08. Índice de lei da potencia apresentado por cada amostra, nas diferentes concentrações avaliadas.

Concentração	Enzimática	Nativa	NaOH 1%	NaOH 5%	KOH 1%	KOH 5%	Comercial
10,00 mg/mL	0,996	0,990	0,985	0,987	0,990	0,989	0,980
12,50 mg/mL	0,994	0,984	0,978	0,978	0,979	0,978	0,972
15,00 mg/mL	0,990	0,974	0,962	0,946	0,969	0,972	0,958

Testes de varredura de tensão foram realizados para determinar o intervalo de no qual as amostras apresentaram resposta viscoelástica linear aos testes oscilatório dinâmicos. De acordo com os testes, a deformação de 8% para realizar os ensaios de varredura de frequência da amostra enzimática e deformação de 1% para as demais amostras foram as mais adequadas a fim de proporcionar tanto uma resposta linear quanto valores adequados de torque do equipamento utilizado para a realização das medidas.

A **Figura 26** mostra os gráficos de varredura de frequência realizados com a amostra enzimática. Em tais gráficos é possível observar que o valor de G'' é sempre superior ao valor de G' . Este resultado mostra que a amostra obtida de forma enzimática não apresenta um comportamento de gel. Tal comportamento, mais uma vez, pode ser atribuído à quantidade de sulfato presente na amostra, uma vez que a estrutura do ágar é fortemente influenciada pela presença de grupos carregados, que atuam nas pontes de hidrogênio (FREILE-PELEGRÍN, ROBLEDO, 1997). Esta afirmação pode ser comprovada quando são comparados os gráficos da **Figura 26** (amostra enzimática) e os gráficos das **Figuras 27** (amostra nativa), **Figura 28** (NaOH 1 %), **Figura 29** (NaOH 5 %), **Figura 30** (KOH 1 %), **Figura 31** (KOH 5 %). A amostra enzimática, que apresentou teor de sulfato superior às outras amostras, possui valor de G'' superior ao de G' em todas as concentrações testadas; relação contrária a esta é observada nas demais amostras. A partir desta relação; na qual G' é superior a G'' nos gráficos de varredura de frequência das amostras Nativa, NaOH 1%, NaOH 5%, KOH 1%, KOH 5%; é possível concluir que tais amostras têm comportamento de gel fraco. As forças apresentadas por tais géis são,

entretanto, inferiores à força do gel formado por ágar comercial (**Figura 32**), que apresenta espectro mecânico de gel forte, e que foi utilizado como controle positivo para os testes reológicos.

Figura 26. Testes de varredura de frequência da amostra Enzimática realizados nas concentrações 10,0 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹ e 15,0 mg.mL⁻¹.

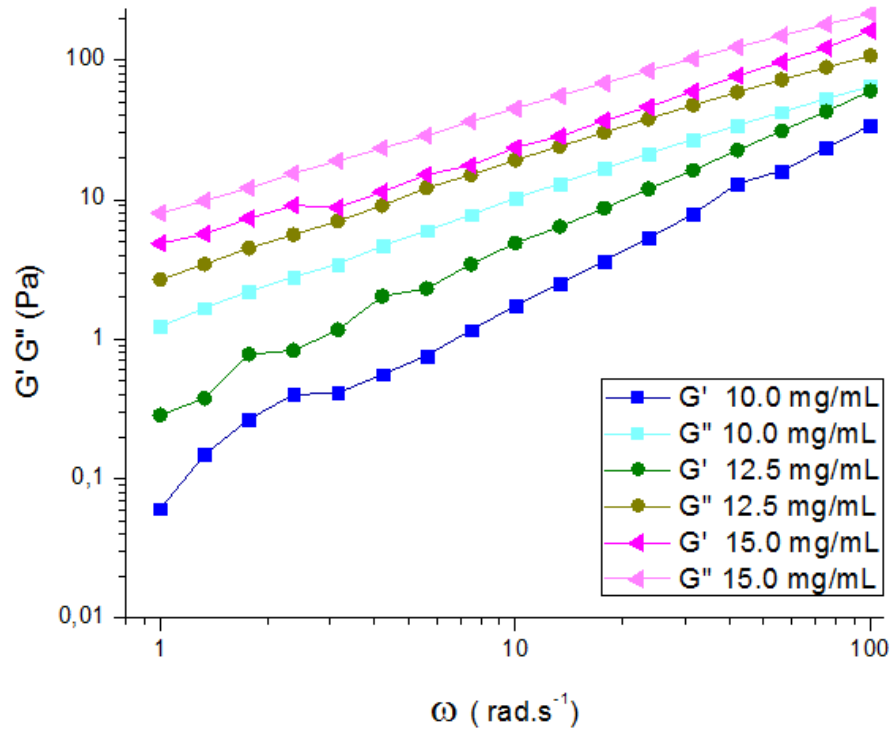


Figura 27. Testes de varredura de frequência da amostra Nativa realizados nas concentrações de 10,0 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹ e 15,0 mg.mL⁻¹.

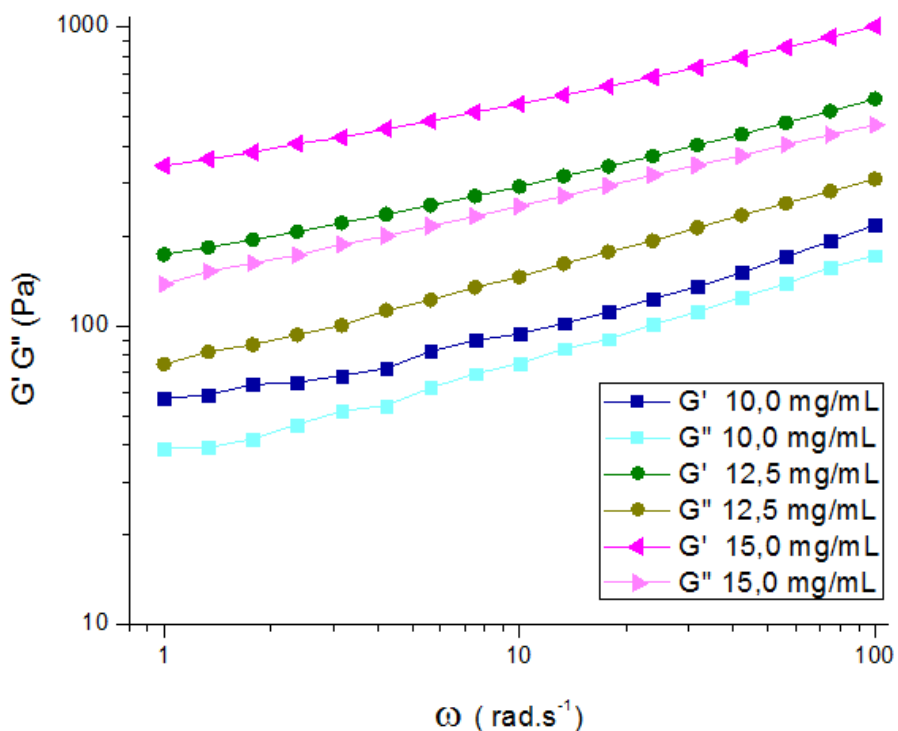


Figura 28. Testes de varredura de frequência da amostra NaOH 1% realizados nas concentrações 10,0 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹ e 15,0 mg.mL⁻¹.

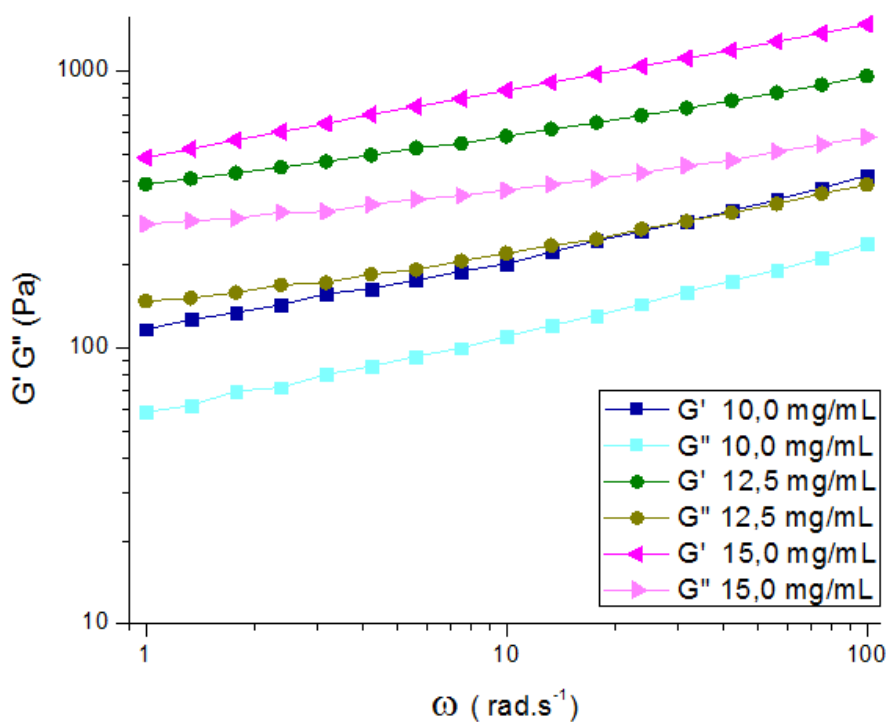


Figura 29. Testes de varredura de frequência da amostra NaOH 5% realizados nas concentrações 10,0 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹ e 15,0 mg.mL⁻¹.

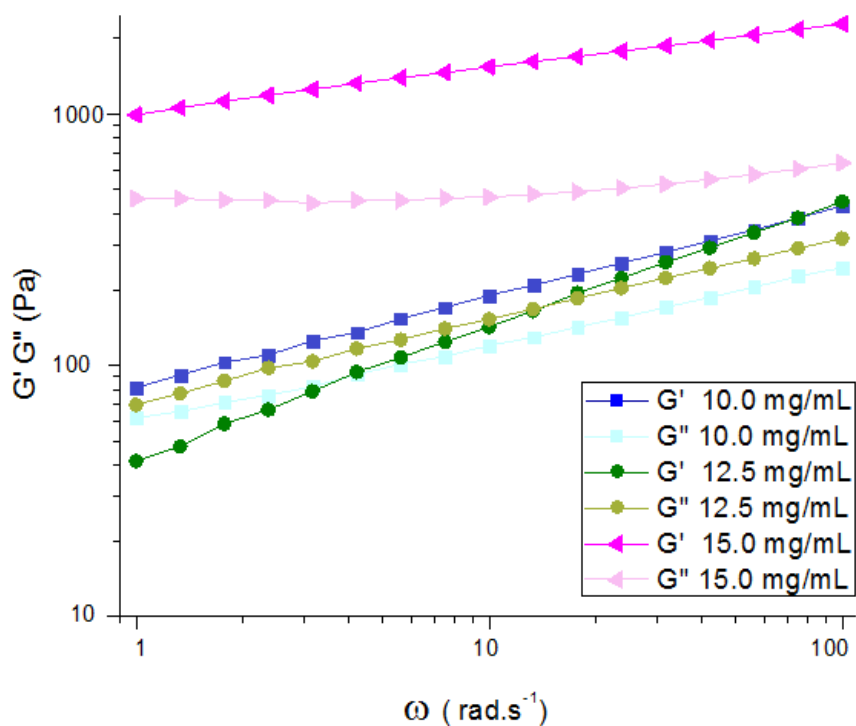


Figura 30. Testes de varredura de frequência da amostra KOH 1% nas concentrações 10,0 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹ e 15,0 mg.mL⁻¹.

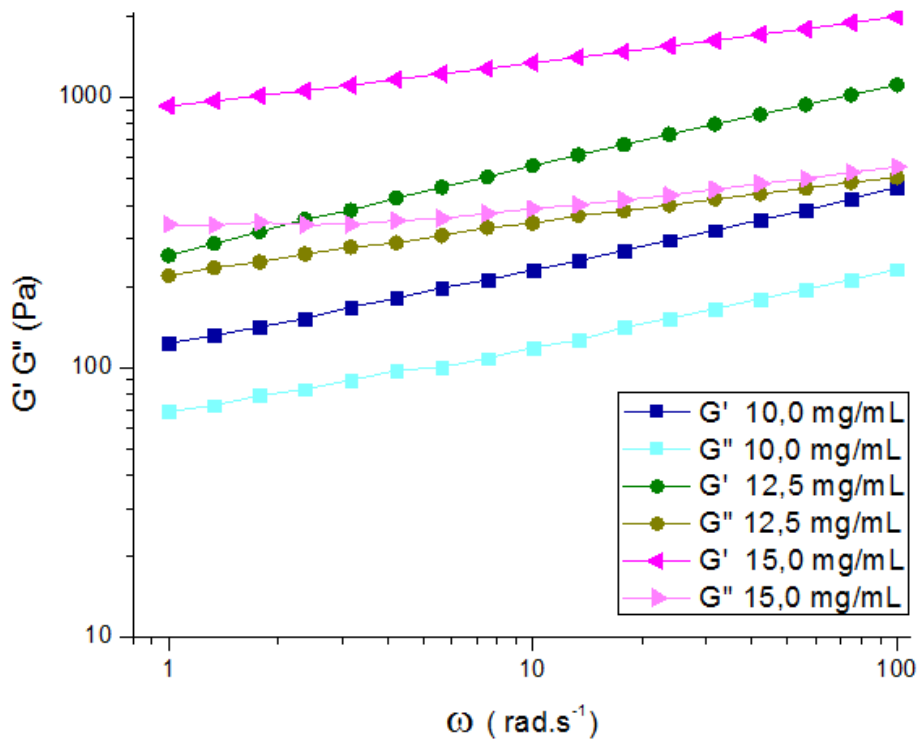


Figura 31. Testes de varredura de frequência da amostra KOH 5% realizado nas concentrações 10,0 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹ e 15,0 mg.mL⁻¹.

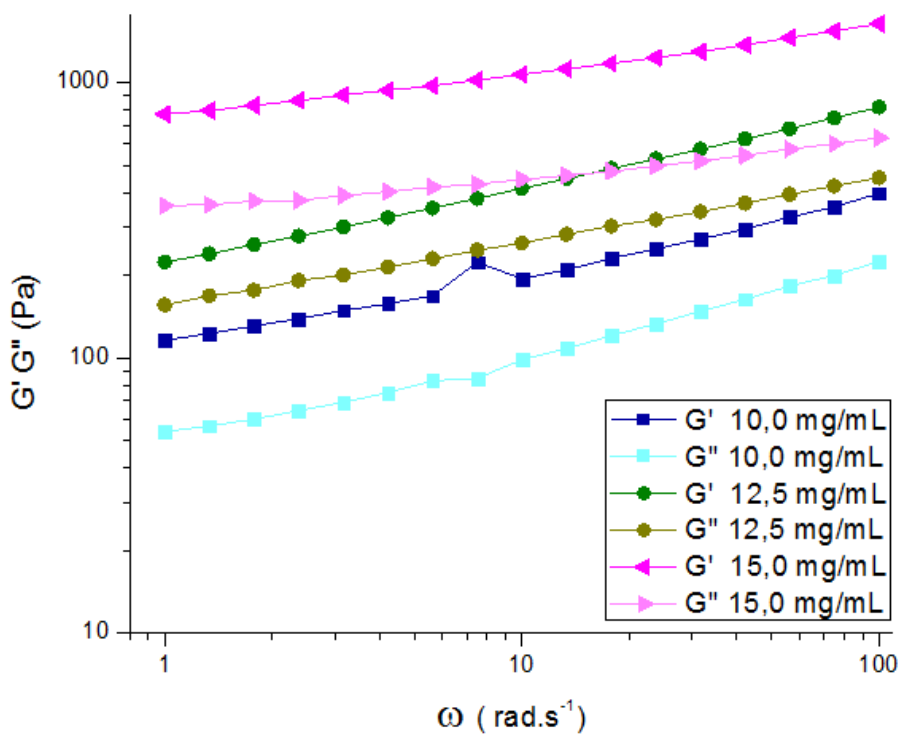
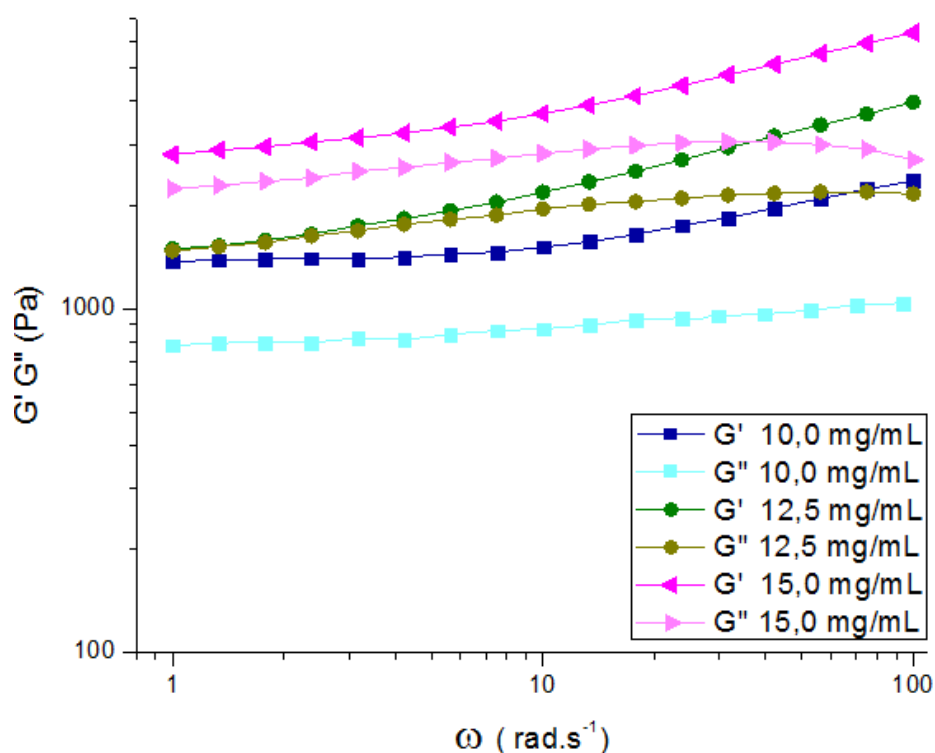


Figura 32. Testes de varredura de frequência da amostra Comercial realizados nas concentrações $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $15,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.



Embora os espectros mecânicos obtidos pelas frações polissacarídicas obtidas a partir de *Gracilaria intermedia* demonstrem uma menor força frente ao gel do ágar comercial, suas propriedades são adequadas a uma ampla variedade de produtos. Os géis considerados fracos são extensamente utilizados como agentes gelificantes em alimentos de textura macia, como as geleias e as compotas (FREILE-PELEGRÍN, MURANO, 2005).

6. CONCLUSÕES

A alga marinha *Gracilaria intermedia* pode ser considerada como uma rica fonte de ágar com atividade antioxidante.

Diferentes tipos de extração de polissacarídeos resultaram em ágar com diferentes características de composição química, de capacidade antioxidante e de comportamento reológico. As extrações que utilizam pré-tratamento alcalino mostraram-se metodologias eficazes em reduzir o percentual de sulfato e aumentar os teores de 3,6 anidrogalactose dos materiais extraídos, parâmetros de fundamental importância para o aumento da força dos géis formados por tais materiais quando em solução. A extração realizada de maneira enzimática se mostrou eficaz em selecionar polissacarídeos sulfatados.

Todas as frações obtidas apresentaram capacidade antioxidante, sendo o teor de sulfato diretamente relacionado a tal atividade.

A caracterização reológica permitiu atribuir classificar as amostras quanto à formação ou não de gel e a força deste.

A fração polissacarídica obtida de maneira enzimática, quando em solução, não apresentou cor ou odor. Tal fração foi capaz de exercer atividade antioxidante superior a todas as outras frações em estudo. Entretanto, não possui capacidade de gelificação, podendo vir a ser utilizada como um agente espessante em diversas preparações alimentícias e farmacêuticas, sobretudo quando características antioxidantes não sintéticas fazem-se necessárias.

As frações polissacarídicas obtidas com tratamento alcalino, quando em solução aquosa, resultaram em géis com força superior ao material obtido sem pré-tratamentos (nativa). Tais materiais, entretanto, possuem capacidade de gelificação inferior ao gel obtido a partir do ágar para meio de cultura, utilizado como controle positivo neste estudo. Todas as frações polissacarídicas obtidas com tratamento alcalino e mesmo a amostra com extração nativa possuem capacidade de gelificar soluções e podem vir a ser utilizados em diversas preparações alimentícias e farmacêuticas. Estas características aliadas às favoráveis características produtivas das algas do gênero *Gracilaria* e à abundância da mesma em praias da costa

cearense fazem da alga *Gracilaria intermedia* uma promissora fonte de extração de ágar.

Pesquisas posteriores devem ser realizadas no sentido de avaliar outras metodologias de extração de ágar da espécie em estudo e também para verificar a aplicação dos materiais obtidos neste estudo em produtos específicos, visando sua aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

ALISTE, A. J. **Uso de substâncias antioxidantes na resposta a radiação dos hidrocoloides carragenanas, agaranas e alginatos utilizados na indústria alimentícia.** 2006. 104p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear- Aplicação). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

ALVES, M. M. M. A Reologia. In **A Química e a Reologia no Processamento de Alimentos** (A.G. Castro). Instituto Piaget, Lisboa, 2003.

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

AMORIM, R. N. S.; RODRIGUES, J. A. G.; HOLANDA, M. L.; QUINDERE, A. L. G.; PAULA, R. C. M.; MELO, V. M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antimicrobial Effect of a Crude Sulfated Polysaccharide from the Red Seaweed *Gracilaria ornata*. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v.55, n.02, pp. 171-181, 2012.

ARMISÉN, R., GÁLATAS, F., Production, properties and uses of agar. In: MCHUGH, D.J. (Ed.), Production and Utilization of Products from Commercial Seaweed. **Fish Technical Papers**. FAO, pp. 228–240, 1987.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (A.O.A.C). **Official methods of analysis of the association of official analytical chemistry.** 15 ed. Arlington: Virginia, 1115p. 1990.

BARAHONA, T.; CHANDÍA, N. P.; ENCINAS, M. V.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E. A. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 3, p. 529-535, 2011.

BARNES, H. A. Thixotropy-a review. *J. Non-Newtonian Fluid Mech*, v. 70, p. 1-33, 1997.

BARROS, F.C.N., SILVA, D.C., SOMBRA, V.G., MACIEL, J.S., FEITOSA, J.P.A, FREITAS, A.L.P., DE PAULA, R.C.M. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, pp. 598– 603, 2013.

BOLD, H.C; WYNNE, M.J. **Introduction to the algae. Structure and reproduction.** 2 Ed. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs. 720 p. 1985.

BOLMSTEDT, U. Viscosity & Rheology: Theoretical and practical considerations in liquid food processing. **New Food**, v. 3, i. 2, 2000.

BORAL, S.; BOHIDAR, H.B. Hierarchical structures in ágar hydrogels. **Polymer**, v. 50, pp. 5585-5588, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, pp. 248-254, 1976.

BRUMMER, R. **Rheology essentials of cosmetic and food emulsions**. Berlin: Springer, 2006.

BULLERI, F. The seaweed *Caulerpa racemosa* on Mediterranean rocky reefs: from passenger to driver of ecological change. **Ecology**, v. 91, n. 8, p. 2205–2212, 2010.

CANOVAS, G.V.B., MUNIZAGA, G.T. Rheology for the food industry. **Journal of food engennering**. v.67, p. 147-156, 2005.

CARNEIRO, J.G.; DANTAS, A.B.D., TEIXEIRA, D.M.A., PEREIRA, I.K.D., CARNEIRO, M.A., BARBOSA, M.C.F. **Potencial nutricional das algas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Solieria filiformis*: Análises da composição centesimal**. In: *Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação*. Palmas. Anais. Palmas, IFTO, 2012.

CECCHI H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. São Paulo, Editora Unicamp, 2007.

CHENG, H., FENG, S., SHEN, S., ZHANG, L., YANG, R., ZHOU, Y., DING, C. Extraction, antioxidant and antimicrobial activities of *Epimedium acuminatum* Franch. Polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, pp. 101– 108, 2013.

CHOPIN, T., & WHALEN, E. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydrate Research**, v. 246, pp. 51-59.1993.

CHUN-HUI, L., CHANG-HAI, W., ZHI-LIANG, X., YI, W. Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* Miller irrigated with sea water. **Process Biochemistry**, v.42, n. 6, pp. 961-970, 2007.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COSSON, J., DESLANDES, E., ZINOUN, M, MOURADI-GIVERNAUD, A. Carragenans and agars, red algal polysaccharides. **Phycological Research**, v. 11, p. 269-324, 1995.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; TELLES, C. B. S. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. **Marine drugs**, v. 9, n. 6, p. 952-66, 2011.

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.Q., MENEZES, D.B., BEZERRA, M.M., SILVA, A.A.R.S., CHAVES, H., JORGE, R.J.B., EVANGELISTA, J.S.A.M., BENEVIDES, N.M.B. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, pp. 335–341, 2012.

DA CUNHA, P. L. R.; R. C. M. DE PAULA, AND J. P. A. FEITOSA. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: Uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, pp. 649–660, 2009.

DENIS, C., Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). **Food Chemistry**, v. 119, pp. 913-917, 2010.

DICKINSON, E. **An introduction to food colloids**, Oxford: University Press, Chapter 1, 1992.

DODGSON, K. S. & PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, pp. 106-110. 1962

DORE C. M., FAUSTINO D. C., ALVES M. G., WILL L. S., COSTA T. G., SABRY D. A., DE SOUZA R. L. A., ACCARDO C. M., ROCHA H. A., FILGUEIRA L. G., LEITE E. L. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrates Polymers**, v. 91, pp. 467–475, 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, pp. 350-356, 1956.

DURAIRATNAM, M; MEDEIROS, T. M. B; SENA, A. M. Studies on the yield and gel strength of ágar from *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kuetzing (Gracilariales, Rhodophyta) following the addition of calcium. **Hydrobiologia** v. 204/205, pp. 551-553, 1990.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated

galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, pp. 29299-29307, 2000.

FERNANDES, W. R.; RODRIGUES, J. A.; MICHIMA, L. E. DOS S.; SIQUEIRA, R. F. DE. Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, 2012.

FLEURENCE, J., MORANÇAS, M., DUMAY, J., DECOTTIGNIES, P., TURPIN, V., MUNIER, M., BUENO, N.G.P. J. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? **Food Science & Technology**, v. 27, n. 1, pp.57-61. 2012.

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

FREILE-PELEGRÍN, ROBLEDO, D. Influence of alkali treatment on ágar from *Gracilaria cornea* Yucatán Mexico, **Journal of Applied Phycology**, v. 9, pp. 533-539, 1997.

GERUNG, S. G. , KAMURA, S. , OHNO, M. Phenology and ágar yield of *Gracilaria blodgettii* in the tropical water, Okinawa, Japan. **Bulletin of Marine Science**. n. 17, pp. 23-28, 1997.

GIBOREAU, A.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B. Rheological behavior of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. **Journal of Texture Studies**, v. 25, pp 119-137, 1994. Studies 25, 119-137.

GONZÁLEZ-LEIJA, J.A.; HERNÁNDEZ-GARIBAY, E.; PACHECO-RUÍZ, I.; GUARDADO-PUENTES, J.; ESPINOZA-AVALOS, J.; LÓPEZ-VIVAS, J. M.; BAUTISTA-ALCANTAR, J. Optimization of the yield and quality of ágar from *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariiales) from the Gulf of California using an alkaline treatment. **Journal of Applied Phycology**,v. 21, pp. 331-326. 2009.

GRANT, C. A., TWIGG, P.C, SAVAGE, M.D., WOON ,W. H., GREIG, D. Mechanical Investigations on ágar Gels Using Atomic Force Microscopy: Effect of Deuteration. **Macromolecular Materials and Engineering**. v. 297, pp. 214–218, 2012.

HAYASHI, L. Extração, teor e propriedades de carragenana de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. Silva, em cultivo experimental em Ubatuba, SP. 2001. 83p. Dissertação (Mestrado em Botânica). **Instituto de Biociências**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

KUMAR, K. S., GANESAN, K., SUBBA RAO, P. V. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty— An edible seaweed. **Food Chemistry**, v. 107, pp. 289–295, 2008.

LAHAYE M, ROCHAS C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. **Hydrobiologia** v. 48, p. 221-137, 1991.

LAHAYE, M., & YAPHE, W. Effects of seasons on the chemical structure and gel strength of *Gracilaria pseudoverrucosa* ágar (Gracilariales, Rhodophyta). **Carbohydrate Polymers**, v.8, p. 285–301, 1988.

LIU, X., SUN, Z., ZHANG, M., MENG, X., XI, X., YUAN, W., XUE, F., LIU, C. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, pp. 1664– 1670, 2013.

LORBEER, A. J.; THAM , R.; ZHANG , W. Potential products from the highly diverse and endemic macroalgae of Southern Australia and pathways for their sustainable production. **Journal of Applied Phycology**. v.25 p. 717–732, 2013.

MACIEL, J.M., CHAVES, L.S., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, D.I.A., FREITAS, A.L.P., FEITOSA, J.P.A., PAULA, R.C.M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 559-565, 2008.

MARINHO-SORIANO,E.; FONSECA, P.C.; CARNEIRO, M.A.A.; MOREIRA, W.S.C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresource Technology** , v. 97,pp. 2402-2406, 2006.

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

MARINHO-SORIANO, E., BOURRET, E. . Effects of season on the yield and quality of ágar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 90, pp. 329-333, 2003.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E; CASABIANCA, M.L.DE; MAURY, L. ÁGAR from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastoris*. **Bioresource Technology**. n.1, 1999.

MATSUHIRO, B. Aislamiento y caracterización de ficocoloides. In: ALVEAL, K.; FERRARIO,M. E.; OLIVEIRA, E. C. & SAR, E. (eds). **Manual de métodos ficológicos**. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 657-689pp. 1995.

MAZUMDER, S., GHOSAL, P. K., PUJOL, C. A., CARLUCCO, M. J., DAMONTE, E. B., & RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, pp. 87–95, 2002.

MCHUGH, D. J. A guide to seaweed industry. **FAO Fisheries Technical**. Paper nº 441. Rome, 2003

MEENA, R.; PRASSAD, K.; GANESAN, M.; SIDDHANTA, A. K. Superior quality ágar from *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) collected from the Gulf of Mannar, Índia. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 397-402, 2008.

MEHTA, G. K.; MEENA R.; PRASAD, K.; GANESAN, M.; SIDDHANTA, A.K. Preparation of galactans from *Gracilaria debilis* and *Gracilaria salicornia* (Gracilariales, Rhodophyta) of Indian waters. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, pp. 623-627, 2010.

MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A. S. Antithrombinmediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides. **Journal of Biologic Chemistry**, v. 279, p. 20824-20835, 2004.

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

MILLER, I. J.; FURNEAUX, R. H. The structural determination of the agaroid polysaccharide from four New Zealand algae in the order Ceramiales by means of C-13 NMR spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 40, pp. 333–339, 1997.

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

MOURADI-GIVERNAUD, A.; HASSANI, L. A.; GIVERNAUD, T.; LEMOINE, Y.; MURUGAN, K., IYE, V.V. Differential growth inhibition of cancer cell lines and antioxidant activity of extracts of red, brown, and green marine algae. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 49, n. 5, p. 324-334, 2013.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Savier, 2010.

OLIVEIRA, L. S.; RUFINO, M. S. M.; MOURA, C. F. H.; CAVALCANTI, F. R.; ALVES, R. E.; MIRANDA, M. R. A. The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata*) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 23, n. 2, 2011.

OLIVEIRA, M. C. DE; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 6, 2010.

PAREKH, R. G., DOSHI, Y. A., RAO, V. D., & CHAUHAN, V. D. Studies on a phycocolloid from red alga *Halymenia venusta* Boergesen. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 16, p. 274-276. 1987

PEARSON, D., COX, H.E., **The chemical analysis of foods**. 7 ed. Edinburgh; New York: Churchill, Livingstone, 1976.

PRADO-FERNÁNDEZ, J., RODRÍGUES-VÁZQUEZ, J. A., TOJO, E., & ANDRADE, J. M. Quantitation of k-, i- and l-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, pp. 23-37, 2003.

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

PRASAD, K.; SIDDHANTA, A. K.; GANESAN, M.; RAMAVAT, B. K.; JHA, B.; GHOSH, P. K. Agars of *Gelidiella acerosa* of west and southeast coasts of India. **Bioresource Technology**, v. 98, pp. 1907 – 1915, 2007.

PRIETO, P., PINEDA, M., AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, v. 269, pp. 337–341, 1999.

QI, H., ZHANG, Q., ZHAO, T., CHEN, R., ZHANG, H., NIU, X., LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 195-199, 2005.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7. ed. , Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REBELLO, J.; OHNO, M.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Agar quality of commercial agarophytes from different geographical origins: 1. Physical and rheological properties. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, pp 517-521, 1997.

ROCHAS, C., LAHAYE, M., & YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. **Botanica Marina**, 29, 335-340, 1986.

ROLEDA M.Y., MONTAÑO N.E., GANZON-FORTES E.T., VILLANUEVA R.D. Acetic acid pretreatment in ágar extraction of Philippine *Gelidiella acerosa* (Forsskaal) Feldmann et Hamel (Rhodophyta, Gelidiales). **Botanica Marina**, v. 40, p.63-69, 1997.

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

SATO, A.C.K., CUNHA, R.L., Influence of temperature on the rheological behavior of jaboticaba pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 890-896, 2007.

SCHRAMM, G., **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**, São Paulo, Artliber, 2006.

SILVA, D. DA C.; CERCHIARO, G.; HONORIO, K. M.. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, 2011.

SOUZA, B.W.S, CERQUEIRA, M.A., MARTINS, J. T., QUINTAS, M.A.C., FERREIRA, A.C.S., TEIXEIRA, J.A., VICENTE, A.A. Antioxidant Potential of Two Red Seaweeds from the Brazilian Coasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, pp. 5589–5594, 2011.

SOUZA, B. W. S., CERQUEIRA, M. A., BOURBON, A. I., PINHEIRO, A.C., MARTINS, J. T., TEIXEIRA, J. A., COIMBRA, M. A., VICENTE, A. A. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 27, pp. 287-292, 2012.

STEFFE, J.F. **Rheological methods in food process engineering**. Michigan: Freeman Press, 428p. 1996.

TABARSA, M. REZAEI, M. RAMEZANPOUR, Z. ROBERTWAALAND. J. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. **Journal Science Food Agriculture**, v. 82, n. 12, p. 2500-2506. 2012.

TOLEDO, R. T. **Fundamentals of Food Process Engineering**. New York: Chapman & Hall, 602p.1991.

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

VALIENTE, O., FERNANDEZ, L. E., PEREZ, R. M., MARQUINA, G., & VELEZ, H. Agar polysaccharides from red seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder exKutzing and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. **Botanica Marina**, v. 35, pp. 77–81, 1992.

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

VIJAYABASKAR, P.; VASEELA, N.; THIRUMARAN, G. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 6, p. 421-428, 2012.

VILLANUEVA, R. D.; MONTAÑO, N. E.; ROMERO, J. B.; ALIGANGA, A. K. A. & ENRIQUEZ, E. P. Seasonal variation in the yield, gelling properties and chemical composition of agars from *Gracilaria eucheumoides* e *Gelidiella acerosa* (Rhodophyta) from Philippines. **Botanica Marina**. v.42, p. 175-182, 1999.

VISHCHUK, O. S.; ERMAKOVA, S. P.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 17, p. 2769-76, 2011.

VOLLHARDT, K.; SHORE, N.; **Química orgânica - Estrutura e função**, 4 ed., Porto Alegre: Bookman, 2006.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; SONG, H.; LI, P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 6-12, 2010.

Wu, M., Wu, Y., Qu, M., Li, W., Yan, X.. Evaluation of antioxidant activities of water-soluble polysaccharides from brown alga *Hizikia fusiformis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, pp. 28– 33, 2013

Yang, X., Yang, S., Guo, Y., Jiao, Y., Zhao, Y. Compositional characterisation of soluble apple polysaccharides, and their antioxidant and hepatoprotective effects on acute CCl₄-caused liver damage in mice. **Food Chemistry**, v. 138, pp.1256–1264, 2013.

YANG, Y.; LIU, D.; WU, J.; CHEN, Y.; WANG, S. In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 5, p. 1031-7, 2011.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 428-432, 2008.

ZHANG, Z., WANG, F., WANG, M., MA, L., ZENG, X., Extraction optimisation and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from *Allium macrostemon* Bunge. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 723–730, 2012.

ZHANG, Z., WANG, X., ZHANG, J., ZHAO, M. Potential antioxidant activities in vitro of polysaccharides extracted from ginger (*Zingiber officinale*). **Carbohydrates Polymers**, v. 86, n. 2, p. 448-452, 2011.