



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

WILLER MALTA DE SOUSA

EFEITO ANTIOXIDANTE E GASTROPROTETOR DE UMA FRAÇÃO  
POLISSACARÍDICA SULFATADA ISOLADA DA ALGA VERMELHA *Solieria filiformis*

FORTALEZA-CE

2015

WILLER MALTA DE SOUSA

EFEITO ANTIOXIDANTE E GASTROPROTETOR DE UMA FRAÇÃO  
POLISSACARÍDICA SULFATADA ISOLADA DA ALGA VERMELHA *Solieria filiformis*

Dissertação de Mestrado submetida à coordenação do curso 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.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Ponte  
Freitas

FORTALEZA-CE

2015

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

---

S698e

Sousa, Willer Malta de.

Efeito antioxidante e gastroprotetor de uma fração polissacarídica sulfatada isolada da alga vermelha *Solieria fliiformis* / Willer Malta de Sousa. – 2015.

84 f. : il. color., ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

Coorientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

1. Polissacarídeos. 2. Algas Vermelhas. 3. Glutathione. 4. Ação antioxidante. I. Título.

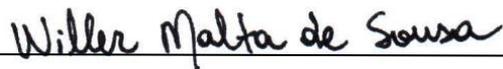
---

CDD 574.192

WILLER MALTA DE SOUSA

EFEITO ANTIOXIDANTE E GASTROPROTETOR DE UMA FRAÇÃO  
POLISSACARÍDICA SULFATADA ISOLADA DA ALGA VERMELHA *Solieria filiformis*

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso 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, área de Concentração em Bioquímica Vegetal. Este trabalho encontra-se à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade. A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.

  
\_\_\_\_\_

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Ponte Freitas (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Luciano de Sousa Chaves  
Universidade Federal do Pará

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros  
Universidade Federal do Piauí

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me conceder todas as bênçãos que me fizeram chegar até esse momento de suma importância para minha vida, tanto acadêmica como pessoal.

À minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas** pelo acolhimento em seu laboratório, sua confiança e por ter contribuído para o meu crescimento científico e pessoal. Por todo o respeito e gentileza a mim dedicados ao longo dos dois anos nos quais convivemos.

Ao **Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa**, pela sua co-orientação, atenção, receptividade e pelo apoio na realização desta dissertação.

Aos professores **Luciano de Sousa Chaves** e **Jand-Venes Rolim Medeiros**, por gentilmente aceitarem integrar a banca examinadora deste trabalho.

Ao Laboratório de Polímeros da UFC pela disponibilização de equipamentos para as análises químicas.

Ao Doutorando do Departamento de Farmacologia da UFC, **Renan Oliveira Silva**, pela disposição e ensinamentos nos procedimentos experimentais.

Aos amigos **Prof. Clark Nogueira** e **Felipe Bezerra** pelos esforços e disponibilidade na realização e discussão dos experimentos.

A todos os companheiros de laboratório, que de maneira direta ou indireta, contribuíram para que a realização desse trabalho acontecesse de maneira ordenada e com êxito.

À minha esposa **Josyele Pereira Malta Ramalho**, pela presença constante em minha vida, pelo amor e por me incentivar de todas as formas na realização desse trabalho.

À minha família, por todo o apoio prestado ao longo desses dois anos de mestrado, em que estiveram me incentivando e apoiando toda a minha trajetória acadêmica. Em especial aos meus pais **Francisco José de Sousa** e **Josefa Malta da Silva** por terem me ensinado valores que serão levados por toda a minha vida.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e à CAPES pelo auxílio financeiro.

“Nas grandes batalhas da vida,  
o primeiro passo para a vitória  
é o desejo de vencer”.

*Mahatma Gandhi*

## RESUMO

As algas marinhas vermelhas são consideradas uma rica fonte de moléculas bioativas, com inúmeras propriedades farmacológicas descritas na literatura científica. Neste trabalho a alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foi submetida a uma extração enzimática com papaína para obtenção de uma fração polissacarídica sulfatada (PLS). O material extraído foi submetido a testes espectrofotométricos de composição química, apresentando alto grau de pureza, com teor de sulfatação elevado (1,08). Também foi realizada a caracterização química estrutural através da análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e por ressonância magnética nuclear de próton  $^1\text{H}$  e carbono  $^{13}\text{C}$ , permitindo concluir que a fração PLS é classificada como uma iota-carragenana. A massa molar média do PLS (210,9 kDa) foi verificada através da Cromatografia por Permeação em Gel (GPC), mostrando um sistema homogêneo. Foram realizados, *in vitro*, testes antioxidantes (sequestro do radical DPPH, quelação do íon ferroso e capacidade antioxidante total) da fração PLS em várias concentrações (0,025, 0,050, 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg/mL), utilizando como controle o BHT e EDTA nas concentrações de 2 mg.mL<sup>-1</sup> e 4 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. O PLS apresentou uma IC<sub>50</sub> de 1,77 mg/mL no sequestro do radical DPPH e na atividade antioxidante total a IC<sub>50</sub> encontrada foi de 2,01 mg/mL, enquanto que a capacidade quelante de ferro foi de aproximadamente 39% na dose de 4 mg/mL. Avaliou-se também o efeito protetor do PLS contra lesões gástricas induzidas por etanol, com posterior dosagem de marcadores bioquímicos, nos quais incluem glutathiona (GSH), malondialdeído (MDA) e hemoglobina (Hb). O efeito gastroprotetor do PLS ocorreu de maneira dose dependente, com melhor resposta na dose de 10 mg/Kg. Os níveis de GSH permaneceram elevados no grupo tratado com o PLS, com diminuição significativa das concentrações de MDA, sugerindo que a propriedade gastroprotetora se deve, pelo menos em parte, às propriedades antioxidantes pela inibição de radicais livres e da peroxidação lipídica, além de reduzir os níveis de Hb, sugerindo redução nas lesões hemorrágicas causadas pelo etanol. Os resultados encontrados, mostram potencial para o PLS da alga *Solieria filiformis* ser utilizado futuramente como um composto gastroprotetor, devido a sua atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Solieriacea, polissacarídeos, glutathiona, atividade antioxidante.

## ABSTRACT

The red marine algae are considered a rich source of bioactive molecules with numerous pharmacological properties described in the scientific literature. In this study the red marine alga *Solieria filiformis* was subjected to extraction with papain enzyme to obtain a sulfated polysaccharide (PLS). The extracted material was submitted to spectrophotometric test of chemical composition having high purity with high quantity of sulfation (1,08). Moreover, a chemical structural characterization by Fourier transformer infrared spectroscopy and by nuclear magnetic resonance spectroscopy of  $^1\text{H}$  proton and  $^{13}\text{C}$  carbon was applied, bringing a conclusion where the PLS is classified as a iota-carrageenan. The average molecular weight (210.9 kDa) was verified through Gel Permeation Chromatography (GPC) showing a homogeneous system. Were performed in vitro tests antioxidants (Scavenging of free radical DPPH, chelating ferrous ability and total antioxidant capacity) of fraction PLS in various concentrations (0.025, 0.050, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg.mL<sup>-1</sup>), using as control BHT and EDTA in concentrations of 2.0 and 4.0 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively. The PLS showed an IC<sub>50</sub> of 1.77 mg.mL<sup>-1</sup> in scavenging of DPPH and total antioxidant capacity an IC<sub>50</sub> found was of 2.01 mg.mL<sup>-1</sup>, while the iron chelator capacity was approximately 39% at a dose of 4mg.mL<sup>-1</sup>. Futhermore, the protective effect of PLS against ethanol-induced gastric lesions with subsequent dosage of biochemical markers, which include the glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and hemoglobin (Hb).The gastroprotective effect of PLS with dose dependent manner, with better response at a dose of 10 mg.Kg<sup>-1</sup>. GSH levels remained high in the treated group with PLS, with significant reduction of MDA concentration, suggesting that the gastroprotective property is partly due to the antioxidant properties by inhibition of free radicals and lipid peroxidation. In addition to reducing the levels of Hb, it suggests a reduction in haemorrhagic lesions caused by ethanol. The results obtained from this research show potential for PLS of seaweed *Solieria filiformis* be used in future as a gastroprotective compound due to its antioxidant activity.

**Keywords:** Solieriacea, polysaccharides, glutathione, antioxidant activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Representação esquemática estrutural das galactanas de algas vermelhas.....	20
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura química da agarose, também chamada de agarobiose (1) e da agarpectina (2).....	21
<b>Figura 3 -</b>	Estrutura química básica de carregenanas com unidades D-alternantes.....	22
<b>Figura 4 -</b>	Representação esquemática dos efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica.....	28
<b>Figura 5 -</b>	Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	29
<b>Figura 6 -</b>	Vias de transformação de um radical superóxido no organismo.....	31
<b>Figura 7 -</b>	Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i> e sua classificação taxonômica.....	34
<b>Figura 8 -</b>	Esquema de extração da fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i> .....	37
<b>Figura 9 -</b>	Curvapadrão para a estimativa da concentração de carboidratos.....	47
<b>Figura 10 -</b>	Curvapadrão para a estimativa da concentração de proteínas.....	48
<b>Figura 11 -</b>	Perfil cromatográfico do PLS extraído da alga <i>Solieria filiformis</i> em cromatografia de permeação em gel (GPC) .....	51
<b>Figura 12 -</b>	Espectro de FT-IR em pastilhas de KBr do PLS extraído da alga <i>Solieria filiformis</i> na região entre 1400 – 700 cm <sup>-1</sup> .....	52
<b>Figura 13 -</b>	Espectros de RMN do PLS extraído da alga <i>Solieria filiformis</i> em solução de D <sub>2</sub> O; (A) <sup>13</sup> C RMN (B) <sup>1</sup> H RMN.....	56
<b>Figura 14 -</b>	Estabilização do radical livre 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).....	57
<b>Figura 15 -</b>	Efeito do sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) do PLS extraído da alga <i>Solieria filiformis</i> .....	58
<b>Figura 16 -</b>	Habilidade de queleção do íon ferroso do PLS extraído da alga <i>Solieria filiformis</i> .....	59
<b>Figura 17 -</b>	Capacidade antioxidante total do PLS extraído da alga <i>Solieria filiformis</i> .....	61

<b>Figura 18 -</b>	Efeito protetor do PLS da alga <i>Solieria filiformis</i> em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos.....	63
<b>Figura 19 -</b>	Efeito do PLS da alga <i>Solieria filiformis</i> nos níveis de glutathione (GSH) na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%.....	65
<b>Figura 20 -</b>	Efeito do PLS da alga <i>Solieria filiformis</i> nos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%.....	66
<b>Figura 21 -</b>	Efeito do PLS da alga <i>Solieria filiformis</i> nas concentrações de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%.....	68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Rendimento e análise os PLS extraídos da alga <i>Solieria filiformis</i> .	49
<b>Tabela 2</b> -	Atribuições às bandas obtidas em experimentos de infravermelho.	53
<b>Tabela 3</b> -	Assinalamentos de RMN de $^{13}\text{C}$ para o PLS da alga <i>Solieria filiformis</i> .....	54
<b>Tabela 4</b> -	Assinalamentos de RMN de $^1\text{H}$ para o PLS da alga <i>Solieria filiformis</i> .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não-estereoidais
BHA	Butilado de hidroxianisol
BHT	Butilado de hidroxitolueno
BTHQ	Terc-butil-hidroquinona
CAT	Catalase
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
CPG	Cromatografia de permeação em gel
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Ferrozina	Ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p-p'-disulfônico
FT-IR	Espectroscopia de absorção na região do infra-vermelho
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido Clorídrico
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MeOH	Metanol
PLS	Polissacarídeos sulfatados
POX	Peroxidase
RMN	Ressonância magnética nuclear
SOD	Superóxido desmutase

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 As algas.....	16
1.2 Gênero <i>Solieria</i> .....	17
1.3 Polissacarídeos sulfatados.....	18
1.4 Galactanas sulfatadas.....	19
1.4.1 <i>Agaranas</i> .....	20
1.4.2 <i>Carragenanas</i> .....	21
1.5 Propriedades farmacológicas de polissacarídeos sulfatados de algas.....	23
1.6 Atividade antioxidante.....	25
1.7 Lesões gástricas induzidas por etanol.....	27
1.8 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.....	28
1.8.1 <i>Grupos sulfidrílicos não-proteicos e defesa da mucosa gástrica</i> .....	30
1.8.2 <i>Mecanismos de defesa pré-epitelial da mucosa gástrica</i> .....	32
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
<b>3.MATERIAIS.....</b>	<b>34</b>
3.1 Coleta e identificação da alga marinha.....	34
3.2 Animais.....	35
3.3 Soluções e reagentes.....	35

<b>4.MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 Extração e purificação do polissacarídeo sulfatado (PLS).....	36
4.2 Rendimento.....	38
4.3 Análises químicas e estruturais.....	38
4.3.1 Determinação do conteúdo de carboidratos .....	38
4.3.2 Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes.....	38
4.3.3 Determinação do conteúdo de sulfato e carbono.....	39
4.3.4 Cromatografia de permeação em gel.....	40
4.3.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	40
4.3.6 Ressonância magnética nuclear.....	40
4.4 Sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH).....	41
4.5 Ensaio de quelação do íon ferroso.....	41
4.6 Ensaio de capacidade antioxidante total pela formação do complexo fosfomolibdênio.....	42
4.7 Lesões gástricas induzidas por etanol.....	43
4.7.1 Efeito do polissacarídeo sulfatado em lesões gástricas induzidas por etanol .....	43
4.8 Níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica dos animais.....	43
4.9 Concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica dos animais.....	44
4.10 Quantificação dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais.....	44
4.11 Análise estatística.....	45
<b>5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
5.1 Extração e rendimento do PLS.....	46
5.2 Análises químicas e estruturais.....	47
5.2.1 Determinação do conteúdo de carboidratos .....	47
5.2.2 Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes.....	48
5.2.3 Determinação do conteúdo de sulfato e carbono.....	49
5.2.4 Cromatografia de permeação em gel.....	50
5.2.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	51

5.2.6 Ressonância magnética nuclear.....	54
5.3 Sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH).....	57
5.4 Ensaio de quelação do íon ferroso.....	59
5.5 Ensaio da capacidade antioxidante total pela formação do complexo fosfomolibdênio.....	60
5.6 Efeito protetor do PLS em lesões gástricas induzidas por etanol.....	61
5.7 Efeito do PLS nos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica .....	64
5.8 Efeito do PLS nos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica	66
5.9 Efeito do PLS nas concentrações de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica .....	67
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 As algas

As Algas constituem uma grande variedade de organismos, que em geral, são remotamente relacionados uns aos outros, sendo assim um grupo polifilético que possui representantes nos Domínios Eubacteria e Eukarya. Estas possuem funções biológicas semelhantes às plantas, como a de produtores primários, mas não possuem semelhanças evolutivas e, bioquimicamente, diferem significativamente (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011; BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

Dentre os organismos marinhos, as algas representam a base da cadeia alimentar, além de serem responsáveis pela liberação significativa de oxigênio, através da atividade fotossintética. A distribuição das algas marinhas depende de vários fatores, entre eles: temperatura, salinidade da água, disponibilidade de luz solar, das correntes marítimas e das condições físicas e químicas (EL GAMAL, 2010).

De acordo com Raven; Evert e Eichhorn (2007) as algas são classificadas como eucariotos do Reino Protista, pois diferem dos vegetais (Reino Plantae) por serem desprovidas de raízes, caule, folhas e frutos. Elas também podem ser classificadas em microalgas e macroalgas, onde estão subdivididas entre os filos Phaeophyta (algas pardas), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas pardas são representadas por cerca de 1.500 espécies, em que grande parte está presente nas regiões de águas marinhas com temperaturas mais baixas; estas algas apresentam tamanhos que variam de 30 cm a 20 m de comprimento. O filo das algas verdes possui aproximadamente 17.000 representantes, com tamanhos variando de poucos centímetros até aproximadamente 1 m de comprimento, as quais habitam ambientes aquáticos, sejam eles dulcícolas ou marinhos. As algas vermelhas compreendem entre 4.000 a 6.000 espécies, ocorrendo em águas marinhas tanto geladas quanto tropicais, onde possuem tamanhos semelhantes às algas verdes (MCHUGH, 2003).

Em especial, as algas vermelhas, possuem em sua parede celular uma fração fibrilar rígida, embebida por uma matriz amorfa, conferindo dessa maneira

resistência. Esta fração rígida consiste em pequenas quantidades de carboidratos, como a celulose, além de outras moléculas como glicoproteínas e galactanas (FLORES *et al.*, 1997; LECHAT *et al.*, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). A matriz mucilaginosa é composta por galactanas sulfatadas, agaranas e/ou carragenanas, aos quais estão relacionadas a funções de regulação osmótica ou iônica (KLOAREG; QUATRANO, 1988), além de participarem como mecanismos de defesa das algas às respostas ambientais (ANDRADE *et al.*, 2010).

Recentemente, a busca por novos compostos bioativos têm crescido rapidamente e pesquisadores têm relatado que as algas marinhas possuem moléculas com várias atividades biológicas (BARROW; SHAHIDI, 2007; WIJESEKARA; KIM, 2010; WIJESEKARA; YOON; KIM, 2010). Já foram atribuídas aos polissacarídeos de algas marinhas várias atividades farmacológicas, estando essas relacionadas ao tamanho da molécula, tipo de unidades constituintes e o teor de sulfato. O posicionamento dos grupos sulfatos, os tipos de ligação e a geometria da molécula também são importantes para as atividades biológicas (MELO *et al.*, 2004).

As atividades biológicas apresentadas pelos polissacarídeos sulfatados incluem atividade antileishmania (PIRES *et al.*, 2013), antiviral (YASUHARA-BELL; LU, 2010), anticoagulante, anti-nociceptiva, anti-inflamatória, antitumoral (WANG *et al.* 2010; VISHCHUK; ERMAKOVA; ZVYAGINTSEVA, 2011) e gastroprotetora (DAMASCENO *et al.*, 2013). Comparando os filos, as algas vermelhas são responsáveis pela maior fonte de metabólitos biologicamente ativos (EL GAMAL, 2010).

## 1.2 Gênero *Solieria*

Segundo Chiovitti *et al.* (1999) o gênero *Solieria* é formado por aproximadamente 8 espécies. Os gêneros *Kappaphycus* e *Eucheuma* pertencem à família Solieriaceae, e são possivelmente os grupos de algas mais importantes do ponto de vista econômico, pois fornecem fontes comerciais de *kappa*- e *iota*-carragenanas, carboidratos de grande importância na indústria (STORTZ; CERREZO, 2000; ESTEVEZ; CIANCIA; CERREZO, 2004).

As espécies que constituem o gênero *Solieria* são: *Solieria Filiformis* (Kützing) Gabrielson (J. Agardh), *S. chordalis* (C. Agardh) J. Agardh, *S. anastomosa* (Gabrielson et Kraft), *S. dichotoma* (Yoshida), *S. dura* (Zanardini) Schmitz, *S. jaasundii* (Mshigeni et Papenfuss), *S. pacifica* (Yamada) Yoshida e *S. robusta* (Greville) Kylin (WOMERSLEY, 1994).

A alga *Solieria filiformis* é encontrada no litoral do Ceará, possuindo quantidades significativas de *kappa*- e *iota*-carragenanas (MURANO *et al.*, 1997). Por esse motivo acredita-se que as espécies brasileiras nativas podem ser exploradas para diversas aplicações biotecnológicas (ASSREUY *et al.*, 2010; PONTES *et al.*, 2009).

### 1.3 Polissacarídeos sulfatados

Os carboidratos são definidos por Nelson; Cox (2010) como poliidroxiáldeídos ou poliidroxicetonas, ou moléculas que formam estes compostos quando hidrolisadas. A maioria dos carboidratos possui a fórmula empírica  $(CH_2O)_n$ , além de alguns também possuírem nitrogênio, fósforo ou enxofre. Os carboidratos estão divididos em três classes: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (NELSON; COX, 2010).

Os monossacarídeos são carboidratos simples, sendo um aldeído ou uma cetona na presença de pelo menos dois grupos hidróxi na molécula. Os oligossacarídeos são açúcares que contêm cadeias curtas de monossacarídeos ligados entre si por uma ponte éter. Por último, os polissacarídeos são polímeros formados a partir de monossacarídeos, com pelo menos 20 unidades, sejam essas unidades semelhantes ou não. As cadeias dos polímeros podem ser lineares ou ramificadas, sendo o tipo de ligação importante para suas funções biológicas (BERG; TYMOCZKO; STRAYER, 2008; NELSON; COX, 2010).

As principais fontes de polissacarídeos são: nas plantas os exsudatos (goma arábica e goma tragacanto), as sementes (guar e alfarroba), os tubérculos e cereais (amido e inulina), nas frutas (pectina), nos animais (ácido hialurônico, heparina, quitina e quitosana), nos fungos (glucanas), nas bactérias as gomas (xantana, dextrana e gelana) e nas algas (alginatos, carragenanas e agaranas) (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009).

Os polissacarídeos sulfatados são macromoléculas polianiônicas complexas e heterogêneas formadas por unidades repetitivas de açúcares e carregadas negativamente devido à presença concomitante de grupamentos sulfatos, estando presente principalmente em algas marinhas (JIAO *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos são encontrados na matriz extracelular das algas, entretanto, sua função ainda continua pouco conhecida. Alguns autores sugerem que sua principal função seja a proteção contra a desidratação que ocorre em maré baixa, explicando o maior teor de polissacarídeos sulfatados de algas no zoneamento entre marés (MICHEL *et al.*, 2010; DANTAS-SANTOS *et al.*, 2012). A complexidade estrutural destas biomoléculas está relacionada com a condição ambiental encontrada no seu habitat marinho das algas, onde estão sujeitas às variações de umidade, temperatura, salinidade e intensidade luminosa (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Nas algas, além da fração fibrilar da parede celular, existe o componente amorfo menos rígido, o qual confere flexibilidade e o aspecto mucilaginoso característicos das algas marinhas (KLOAREG *et al.*, 1988). A parede celular das algas marinhas vermelhas também é rica em galactanas sulfatadas (agaranas e/ou carregenanas); nas algas pardas estão presentes as fucanas sulfatadas. Nas algas verdes com maior complexidade, os polissacarídeos mais encontrados são arabinogalactanas, ramnanas e ulvanas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

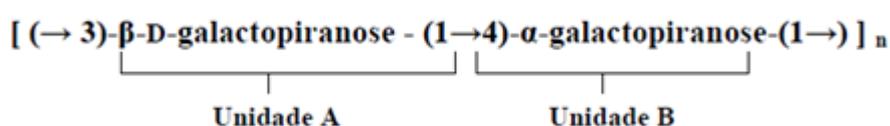
O estudo detalhado das estruturas químicas dos polissacarídeos possui grande importância para correlacionar detalhes estruturais com propriedades físico-químicas ou princípios bioativos apresentados pelos mesmos (USOV; BILAN, 2009). Os polissacarídeos extraídos de algas marinhas estão sendo usados por indústrias farmacêuticas, de cosméticas e de alimentos (ORDONEZ; ESCRIG; RUPEREZ, 2010).

#### **1.4 Galactanas sulfatadas**

As galactanas sulfatadas são frequentemente encontradas na matriz extracelular das algas marinhas vermelhas. Estas são polímeros de açúcares complexos e heterogêneos constituídos por unidades repetitivas alternadas de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) D-galactopiranosose (unidade A) e  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) D- ou L- galactopiranosose (unidade

B), onde ambas as unidades, A e B, podem ser sulfatadas. Algumas unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranoose podem ocorrer também na forma cíclica 3,6-anidrogactopiranoose (PAINTER, 1983). Então, todos os dissacarídeos são formados por duas subunidades, A e B, e o polissacarídeo é constituído pela alternância  $(AB)_n$  (Figura 1).

**Figura 1** - Representação esquemática estrutural das galactanas de algas vermelhas.



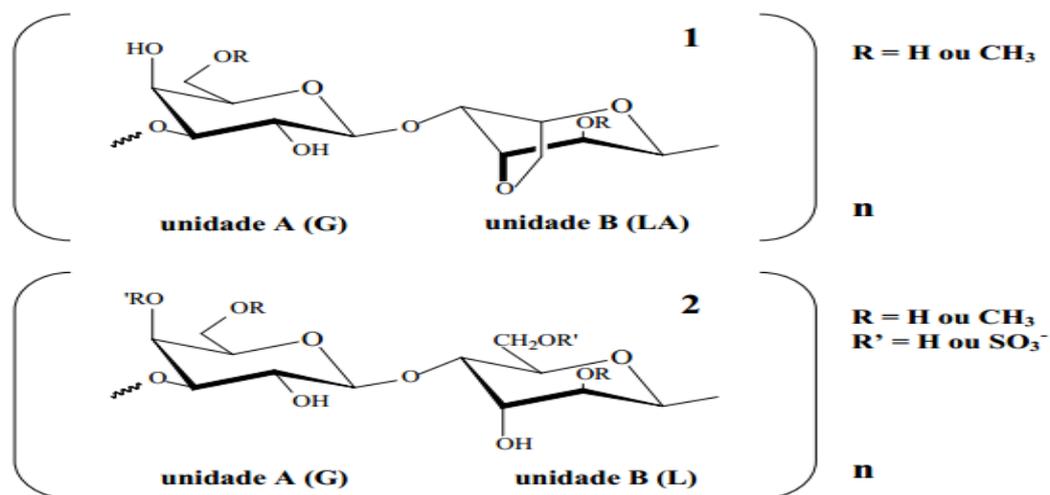
As galactanas são classificadas de acordo com a estereoquímica de suas moléculas, especialmente relacionada com a unidade B (DE ALMEIDA, *et al.*, 2011; MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011). Quando a referida unidade pertence à série D, a galactana é considerada uma carragenana e quando pertecem a série L, é chamada de agaranas (CAMPO *et al.*, 2009).

#### 1.4.1 Agaranas

O ágar é um biopolímero sulfatado que pode ser definido como um hidrocolóide que possui atividade gelificante, encontrado em uma série de famílias de algas vermelhas, principalmente as famílias *Gelidiaceae* e *Glacilariaceae* (ARMISEN, 1995; MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003).

O ágar é formado por unidades de agarose e unidades de agaropectina. A agarose é caracterizada como um polissacarídeo neutro, que possui estrutura linear de unidades repetitivas do dissacarídeo agarobiose (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactose e (1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose. Entretanto, a agaropectina é caracterizada por ser um polissacarídeo ácido contendo sulfato, metil, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico adicionado à agarobiose (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003). Esta estrutura básica repetitiva difere das carragenanas pela forma estereoquímica L da unidade B (Figura 2) (PAINTER, 1983).

**Figura 2** -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)-α-L-galactose formando a unidade B com substituições por grupamentos metil ou sulfato nos átomos indicados.



A produção do gel pelo ágar se faz devido à estrutura molecular em cadeia com formação helicoidal, que produz uma rede capaz de reter considerável quantidade de moléculas de água no interstício. As ligações de hidrogênio formadas entre os átomos de oxigênio presentes no polissacarídeo com moléculas de água são responsáveis pela estabilização da estrutura do gel (LAHAYE; ROCHA, 1991).

### 1.4.2 Carragenanas

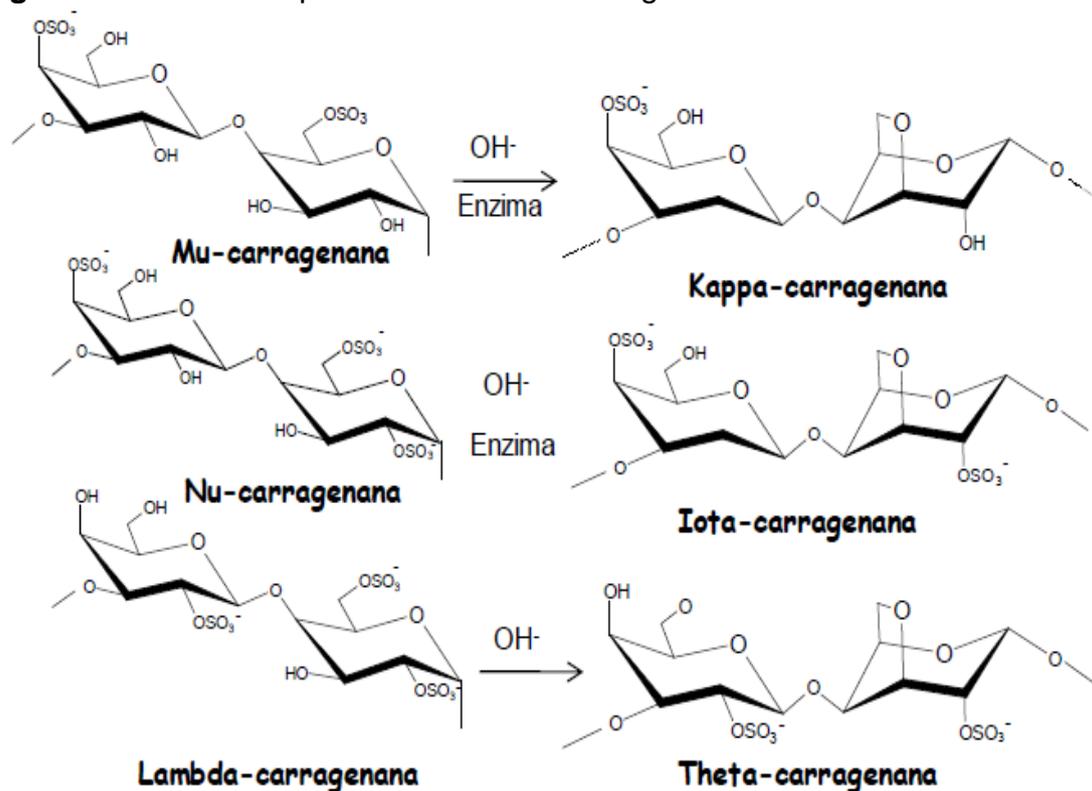
As carragenanas são polissacarídeos extraídos rotineiramente em algas marinhas vermelhas da família das Rhodofíceas (OTHMER, 1992), como *Chondrus crispus*, *Euchema*, *Gigartina stellata*, *Iridaea*, *Hypnea*, *Solieria*, *Agardhiella* e *Sarconema* (CHEN *et al.*, 1973; CHIOVITTI *et al.*, 1999; McCANDLES; WEST; GUIRY, 1983; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998; PAREKH *et al.*, 1979; PAREKH *et al.*, 1988; PAREKH; RAO; CHAUHAN, 1988). Esses polissacarídeos possuem em sua espinha dorsal a estrutura linear D-galactose e 3,6-anidro-α-D-galactose com densidade variável de grupamentos sulfatos (CAMPO *et al.*, 2009).

Os dissacarídeos presentes nas cadeias contêm um β-D-galactopiranosose com outro α-D-galactopiranosose ou 3,6-anidrogalactose, porém outros resíduos podem ser comumente encontrados tais como xilose, glucose e ácidos urônicos. As unidades

de dissacarídeos variam no teor de sulfato, resultando em um conteúdo de sulfatação de 22-38% e massa molecular entre 400 e 600 kDa em carragenanas comerciais (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

Carragenana é um termo que compõe poucas famílias conhecidas de *Lambda* ( $\lambda$ ), *Kappa* ( $\kappa$ ), *Beta* ( $\beta$ ) e *omega* ( $\omega$ ). Essas famílias são subdivididas em diferentes tipos e constituídas de unidades (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactopiranosose (Unid A) e (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-galactopiranosose (Unid B) (BONDU *et al.*, 2010). Rotineiramente são identificadas por letras gregas, sendo divididas em 6 formas básicas, de acordo com a posição dos grupos fosfatos nas unidades A e B e a forma cíclica da unidade B: *Iota* ( $\iota$ ), *Kappa* ( $\kappa$ ), *Lambda* ( $\lambda$ ), *Mu* ( $\mu$ ), *Nu* ( $\nu$ ), *Theta* ( $\theta$ )-carragenanas, sendo esta classificação química de suma importância comercialmente (Figura 3) (CAMPO *et al.*, 2009).

**Figura 3** - Estrutura química básica de carragenanas com unidades D-alternantes.



Fonte: CAMPO *et al.*, 2009.

As carragenanas conhecidas comercialmente apresentam as seguintes estruturas químicas:  $\iota$ -carragenana [(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactopiranosose 4-sulfato- (1 $\rightarrow$ 4) 3,6 anidro- $\alpha$ -D- galactopiranosose 2-sulfato],  $\kappa$ -carragenana [(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactopiranosose 4-sulfato- (1 $\rightarrow$ 4) 3,6 anidro- $\alpha$ -D- galactopiranosose] e a  $\lambda$ -carragenana [(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-

galactopiranosose 2-sulfato- (1→4) 3,6 anidro- $\alpha$ -D- galactopiranosose 2,6-dissulfato]. Os tipos  $\mu$ - e  $\nu$ - carragenanas são formados *in vivo* pela ação da enzima sulfohidrolase (CAMPO *et al.*, 2009).

A carragenana é um ingrediente extremamente versátil, utilizada nas indústrias de alimentos e farmacêutica (VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Com o aumento da demanda dos três tipos,  $\iota$ ,  $\kappa$  e  $\lambda$ , fontes promissoras de carragenanas passaram a ser cultivadas na Península de Yucatán no México durante os últimos anos, como é o caso das espécies de algas marinhas *Eucheuma isiforme*, *Solieria filiformis*, *Halymenia floresii* e *Kappaphycus alvarezii* (ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, 1997).

A indústria alimentícia utiliza cerca de 70 a 80% da carragenana produzida no mundo, no qual 45% são direcionadas aos produtos lácteos e cerca de 30% é utilizado em produtos derivados de carnes. Portanto, o valor estimado de carragenana comercializada no mundo estima-se em 300 milhões de dólares por ano (McHUGH, 2003).

### **1.5 Propriedades farmacológicas de polissacarídeos sulfatados de algas**

Os produtos naturais podem apresentar várias propriedades farmacológicas, servindo para o desenvolvimento de novos compostos e descoberta de novos grupos farmacológicos. Isso é comprovado devido ao elevado número de produtos dessa origem sendo utilizados na terapêutica de diversas patologias (NEWMAN; CRAGG, 2007; AMADOR *et al.*, 2003).

As algas marinhas são fontes ricas de compostos bioativos com uma grande variedade estrutural. Atualmente, cresce o interesse por essas moléculas, devido a vários estudos mostrando seu potencial em atividades biológicas (BARROW; SHAHIDI, 2007; WIJESSEKARA; KIM, 2010). Esse aumento pelo interesse de moléculas bioativas derivadas de algas marinhas tem sido coincidente com a invenção de novas tecnologias de caracterização estrutural, principalmente a espectrometria de ressonância magnética nuclear de alta resolução, que veio desempenhar um papel importante, na associação da estrutura molecular de compostos bioativos de algas marinhas com atividade farmacológica em meios biológicos (HU *et al.*, 2011).

Pérez-Recalde *et al.* (2014) encontraram atividade imunomodulatória *in vitro* e *in vivo* de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha vermelha *Nemalion helminthoides*. As frações polissacarídicas testadas *in vitro* proliferaram macrófagos da linhagem RAW 264.7 e estimularam a produção de óxido nítrico e citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ).

Com relação à atividade antiviral, galactanas extraídas da alga *Cryptonemia seminervis*, as quais apresentaram um teor de sulfatação entre 14.1 – 29.9%, exibiram atividade antiviral em estágios iniciais da infecção viral, inibindo a replicação do metapneumovírus humano (MENDES *et al.*, 2014). Thuy *et al.* (2015) encontraram propriedades antivirais contra o HIV em que as frações polissacarídicas bloquearam os passos iniciais da entrada do vírus nas células-alvo, porém após infecção não obtiveram efeito.

Recentemente, Jiménez-Escrig, Gómez-Ordoñez e Rupérez (2014) em estudo realizado com a alga marrom *Saccharina latissima*, encontraram uma excelente resposta antioxidante das fucanas em associação com o teor de sulfato presente na estrutura do carboidrato.

Em outro estudo, as frações polissacarídicas obtidas de *Sargassum horneri* apresentaram, *in vitro*, atividade antioxidante e antitumoral, em que a fração com maior grau de sulfatação em sua molécula obteve melhor dose-resposta no crescimento de células cancerígenas gástricas e intestinais (SHAO; CHEN; SUN, 2014).

Existem diversos trabalhos que comprovam a atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva de polissacarídeos sulfatados derivados de algas (RIBEIRO *et al.*, 2014; HWANG; HUNG; CHIEN, 2014; KALITNIK *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2014). Pereira *et al.* (2014) exploraram a atividade anti-inflamatória de uma fração polissacarídica da alga *Digenea simplex*, na qual encontraram uma atividade dose dependente na inibição de edema de pata induzido por carragenana, e também reduziu a inflamação induzida por dextrana, histamina, serotonina e bradicinina.

Silva *et al.* (2012), trabalhando com modelos aplicados de lesão gástrica induzidas por naproxeno, encontraram excelente atividade das frações polissacarídicas sulfatadas da alga *Gracilaria birdiae*, às quais reduziram lesões gástricas e intestinais, tanto macroscópicas quanto microscópicas, induzidas pelo anti-inflamatório. Os autores sugeriram que o efeito protetor na mucosa envolve mecanismos de inibição de infiltrado de células inflamatórias e na peroxidação de

lipídios. Brito *et al.* (2014) trabalhando com o mesmo polissacarídeo em modelos de colite induzida por ácido tri-nitro-benzeno-sulfônico (TNBS), além dos mesmos mecanismos de defesa acima citados, sugeriram também que as frações polissacarídicas tem envolvimento na produção e liberação de citocinas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ).

## 1.6 Atividade antioxidante

Radicais livres são moléculas ou átomos simples que possuem um elétron desemparelhado externo à sua órbita. Isso diminui a estabilidade do átomo, ampliando sua capacidade de reagir com outras moléculas ou átomos, principalmente com constituintes celulares como: lipídios de membranas, proteínas e bases nucleicas (FERNANDES *et al.*, 2012). Os radicais livres são fisiologicamente originados na produção de adenosina trifosfato (ATP), considerado a maior fonte de energia química dos seres vivos (NELSON; COX, 2010).

As reações de processos biológicos geram os mais diversos radicais livres, como as Espécies Reativas de Nitrogênio – ERNs (óxido nítrico, peroxinitrila, ácido peronitroso e dióxido de nitrogênio) e as Espécies Reativas de Oxigênio – EROs (ânion superóxido, radical hidroxila, radical peroxila, peróxido de hidrogênio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete e ozônio) (SILVA, CERCHIARO, HONORIO, 2011).

Em pequenas quantidades, as EROs estão envolvidas em importantes funções fisiológicas, porém, quando produzidas demasiadamente o organismo entra em um estado denominado de estresse oxidativo, que pode estar relacionado a processos patológicos, como inflamações, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes melitus, entre outras (SEIFRIZ, 2008; NELSON; COX, 2010; TAKAHASHI, SHIBATA, NIKI, 2001; STEGHENS *et al.*, 2001; DE MORAIS *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo pode ser definido quando os radicais livres ocasionam um dano tecidual ou produzem moléculas tóxicas ou danosas às células. Então, pode-se afirmar que um organismo encontra-se em um estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes. Um dos principais mecanismos de lesão é a lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação de lipídios de membranas (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

Os compostos antioxidantes formam uma família heterogênea de moléculas naturais, presentes em pequenas quantidades quando comparadas a biomoléculas que supostamente protegem, podendo prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011). Esses compostos são divididos em dois grupos: enzimáticos e não-enzimáticos. As principais enzimas envolvidas com propriedades antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a peroxidase (POX) (HUANG *et al.*, 2007). Já entre os compostos não-enzimáticos com atividade antioxidante destacam-se os fenólicos, ácido ascórbico e os caratenóides (HASSIMOTTO *et al.*, 2005 apud DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Antioxidantes são moléculas capazes de prevenir, interceptar e/ou reparar os danos oxidativos às macromoléculas, danos estes causados por radicais livres (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). No organismo, os antioxidantes agem por diversos mecanismos, tais como: complexação de íons metálicos, captura de radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição de enzimas responsáveis pela geração de EROs e ERNs e pela modulação de vias sinalizadoras celulares (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Atualmente, existe a busca constante de polissacarídeos sulfatados derivados de algas marinhas com propriedades antioxidantes (CHENG *et al.*, 2013; DORE *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2012). Esse fato se dá principalmente devido aos compostos antioxidantes sintéticos, tradicionalmente utilizados nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, como o Butilato Hidroxitolueno (BHT), Butilato de Hidroxianisol (BHA) e Terc-Butil-hidroquinona (BTHQ), terem seu uso limitado. Tais limitações são devido às suspeitas desses compostos serem causadores de danos às células hepáticas e também demonstrarem elevado potencial carcinogênico (CHENG *et al.*, 2013; KUMAR; GANESAN; RAO 2008; SOUZA *et al.*, 2011).

As algas marinhas são expostas a condições climáticas intensas, com variações de oxigênio, temperatura e insolação, fazendo com que as mesmas possuam propriedades antioxidantes. Vários trabalhos associam essa atividade aos polissacarídeos sulfatados, constituintes das estruturas desses organismos (COSTA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010).

Existem vários modelos experimentais para avaliar a capacidade antioxidante de determinado composto ou mistura, por meio de diferentes mecanismos, como sequestro do radical DPPH (BLOIS, 1958), sequestro do íon ferroso (CHEW *et al.*,

2008) e capacidade antioxidante total pela formação do complexo fosfomolibdênio (PRIETRO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Infelizmente não existe um único método que possa avaliar toda a capacidade antioxidante de um determinado material (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005). Isto é devido aos diferentes tipos de radicais livres e suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos. Por isso, geralmente são realizados diferentes testes para determinar a capacidade antioxidante total do composto.

### 1.7 Lesões gástricas induzidas por etanol

O etanol é responsável por causar lesões gástricas em humanos. É uma substância tóxica que causa injúria à mucosa do estômago, onde sua ingestão excessiva resulta em uma gastrite aguda, caracterizada por edema de mucosa, hemorragias subepiteliais, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (GUSLANDI, 1987; KO; CHO; LAM, 2004).

Múltiplos mecanismos estão envolvidos no processo patogênico causado pelo excesso de álcool, incluindo a depleção de grupos sulfidrílicos não-proteicos (necessários para a estabilização das membranas celulares e para eliminação de radicais livres), modulação do sistema óxido nítrico e redução do fluxo sanguíneo da mucosa gástrica (MACMATH, 1990; LA CASA *et al.* 2000; SANTOS; RAO, 2001).

No estômago, o etanol aumenta o risco de formação de úlceras, e essas lesões são mediadas principalmente através da liberação de mediadores inflamatórios, devido ao aumento na produção de EROs, que induz a vasoconstrição, isquemia, estresse oxidativo, peroxidação de lipídios e então a morte celular (PAN *et al.*, 2008; PARK, 2011).

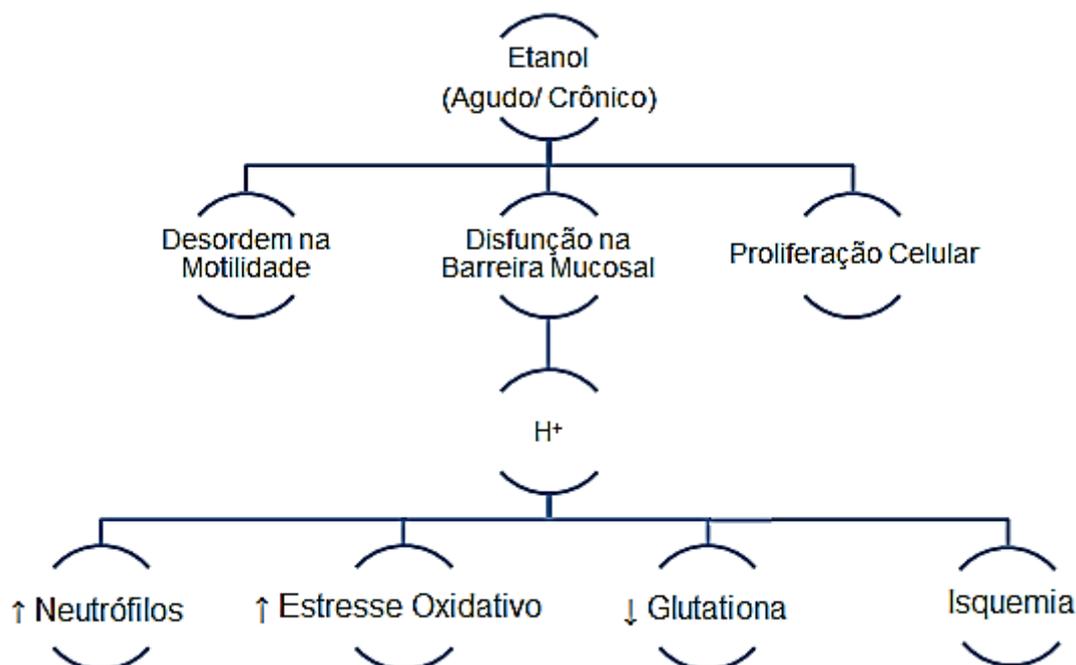
O etanol aumenta a secreção de ácido gástrico, um efeito mediado pelos mediadores histamina e gastrina. A barreira da mucosa é um dos principais mecanismos de proteção da mucosa gástrica contra o ácido gástrico. Em altas concentrações de etanol há aumento na permeabilidade epitelial como consequência de mudanças no potencial celular, causando re-difusão dos íons H<sup>+</sup> (DAVENPORT, 1967; DAVENPORT, 1969).

A depleção de muco protetor ocasionado por excesso de álcool, também é responsável pela formação de úlceras na mucosa gástrica. Isso se dá,

possivelmente, por mobilizar os mucopolissacarídeos da mucosa para o lúmen, reduzindo a capacidade secretória de muco do estômago (ISHIHARA *et al.*, 1988; CHO *et al.* 1989).

Siegmund, Teysen e Singer (2002) representaram os efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica de acordo com a figura 4.

**Figura 4** -Representação esquemática dos efeitos agudos e crônicos do etanol na mucosa gástrica.



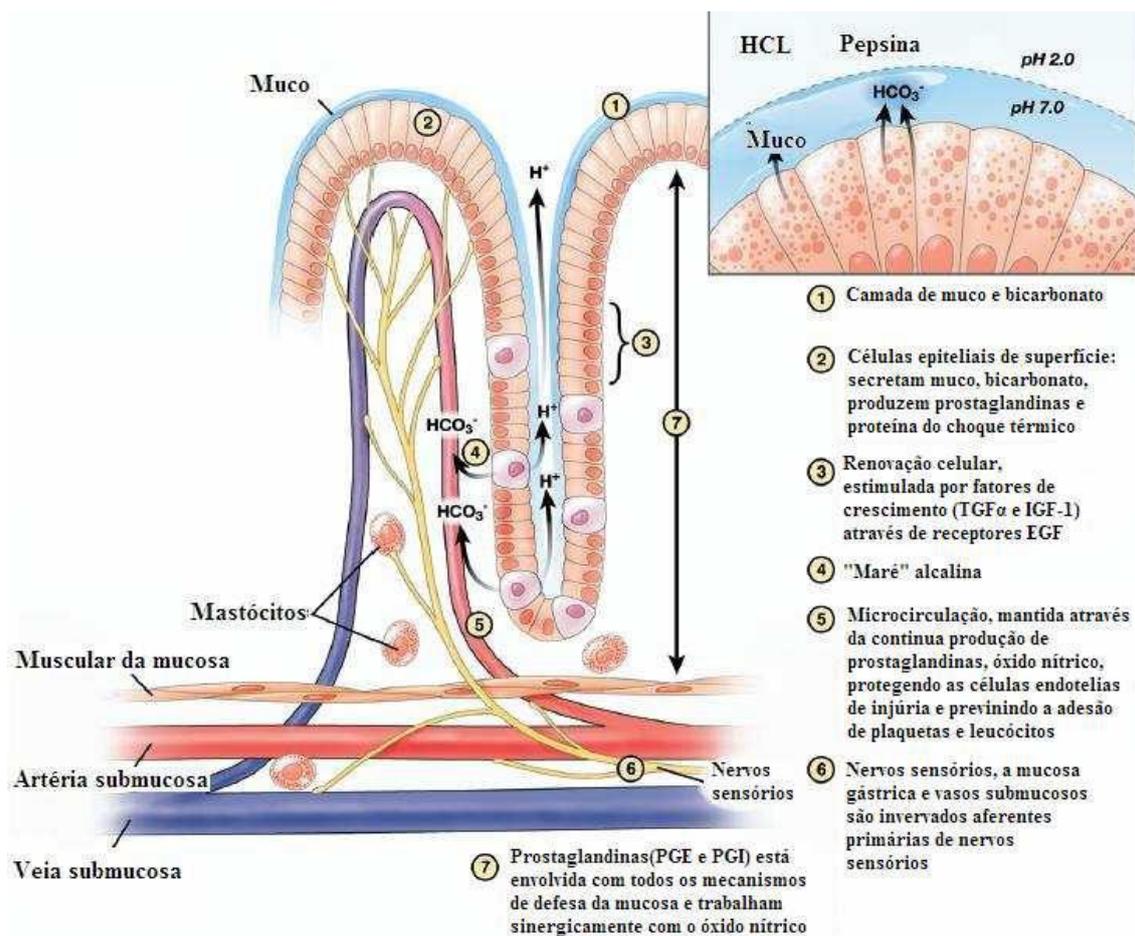
Adaptado de: Siegmund, Teysen e Singer, 2002.

### 1.8 Mecanismos de defesa da mucosa gástrica

A mucosa gástrica é constantemente exposta a fatores nocivos e agressores como o ácido clorídrico (HCl), pepsina e sais biliares, além de possíveis infecções por microrganismos, como *Helicobacter pylori* (ADEYEMI *et al.*, 2005; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). Dessa maneira, a mucosa se defende com uma combinação de fatores, permitindo a mesma a resistir às mais diversas injúrias, através da secreção de muco e bicarbonato, proliferação e restituição celular, fluxo sanguíneo adequado e presença de óxido nítrico, prostaglandinas e compostos

sulfidrílicos não-protéicos (CHEUNG, 1984; HUI *et al.*, 1991; MILLER, 1983). Esses mecanismos de defesa são classificados como: pré-epitelial, epitelial e pós-epitelial (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). A figura 5 ilustra esses mecanismos de defesa.

**Figura 5** - Mecanismos de defesa da mucosa gástrica.



Adaptado de Laine *et al.*, 2008.

O mecanismo de defesa pré-epitelial impede o contato direto de agentes nocivos com a parede gástrica. Fazem parte dessa propriedade a barreira formada de muco, bicarbonato e fosfolípidios superficiais. O efeito protetor epitelial, segunda linha de defesa, previne a difusão de íons H para a mucosa, além de secretar muco, bicarbonato e renovar as células do epitélio. E o terceiro mecanismo, pós-epitelial,

envolve a motilidade gástrica, defesa celular e o controle do fluxo sanguíneo local (MATSUI *et al.*, 2011).

A microcirculação é fundamental para que o oxigênio e nutrientes atinjam as células e possa haver a remoção de substâncias tóxicas. Em casos em que ocorre a difusão de ácido gástrico do lúmen para a mucosa gástrica, há um aumento do fluxo sanguíneo local para ajudar a remover o ácido da mucosa. As fibras nervosas sensoriais à capsaicina têm um papel importante para monitorar o refluxo do ácido e liberar mediadores vasodilatadores (GUTH, 1992).

Um dos mecanismos de lesões ulcerativas na mucosa gástrica está relacionados com a liberação de fatores pró-inflamatórios por leucócitos e macrófagos, como TNF- $\alpha$  e IL-1. Isso acontece devido à isquemia da mucosa, formação de radicais livres e a suspensão da disponibilidade de nutrientes teciduais, resultando em necrose que juntamente com liberação de leucotrienos B, atuam como atraentes de leucócitos e macrófagos (TARNAWSKI, 2005).

### **1.8.1 Grupos sulfidrílicos não-proteicos e defesa da mucosa gástrica**

O principal representante endógeno do *pool* dos grupos sulfidrílicos não-proteicos do nosso organismo é a glutathiona (GSH). A GSH é um tripeptídeo formado por cisteína, glutamato e glicina, que atua como um antioxidante hidrossolúvel, protegendo as células contra radicais livres (PARK *et al.*, 2000; GONZALES *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004; STRUZYNSKA; CHALIMONIUK; SULKOWSKI, 2005).

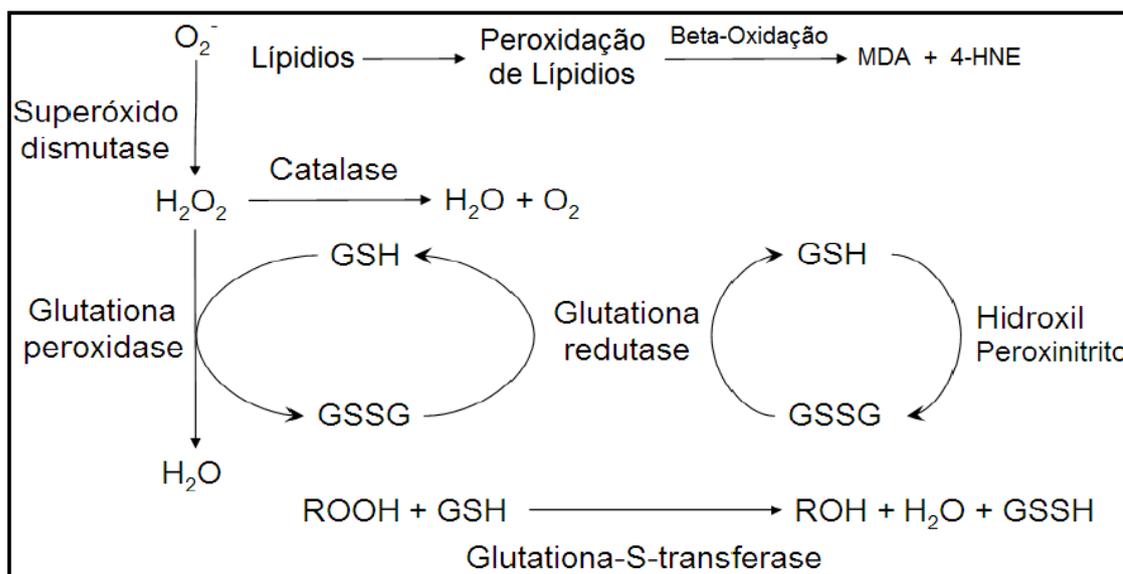
A GSH participa nos mecanismos de defesa da mucosa gástrica. Miller *et al.* (1985) e Mizui *et al.* (1987) mostraram que a GSH está presente em altas concentrações na mucosa gástrica, sugerindo seu papel protetor como antioxidante endógeno. A GSH protege o estômago de lesões causadas por etanol, através da inibição de espécies reativas de oxigênio e produtos da peroxidação de lipídios de membrana (SZABO; NAGY; PLEBANI, 1992).

Esse tripeptídeo possui a capacidade de se ligar rapidamente de forma direta e não-enzimática com radicais hidroxilas, e com N<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> e peroxinitrito impedindo que esses interajam com estruturas importantes nas células (GRIFFITH, 1999). Além de a GSH ser um cofator da enzima GSH-px e, de forma indireta, através da atividade

da Glutathione-S-transferase se liga a compostos eletrofílicos potencialmente lesivos as células (CNUBBEN *et al.*, 2001). Dessa maneira, a GSH atua na prevenção da formação de lesões produzidas por agentes ulcerogênicos, sendo um importante agente gastroprotetor (MAITY *et al.*, 2001).

A produção e liberação de EROs tem recebido atenção como provável fator patogênico das lesões na mucosa gástrica associada com o estresse de drogas anti-inflamatórias e úlceras induzidas por etanol (BILICI *et al.*, 2002). Sendo assim, existe um desequilíbrio entre a formação e a degradação, pelos compostos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, das EROs, que dessa maneira podem ocasionar ações deletérias sobre o epitélio da mucosa gástrica.

**Figura 6** – Vias de transformação de um radical superóxido no organismo.



Fonte: Adaptado de KWIECIEŃ *et al.*, 2002.

A diminuição dos níveis de GSH e o aumento da peroxidação lipídica, com formação de MDA, são fatores reconhecidos que contribuem para o desenvolvimento de lesões gástricas, mostrando-se como marcadores de suma importância na busca de compostos gastroprotetores.

### **1.8.2 Mecanismos de defesa pré-epitelial da mucosa gástrica**

A mucosa gástrica é protegida por uma barreira formada por muco, bicarbonato e fosfolipídios de membrana, constituindo a primeira linha de defesa do estômago contra agentes lesivos (ALLEN; FLEMSTRO, 2005). Esta barreira estabelece um micro-ambiente estável que retém íons bicarbonato secretados. Dessa forma, mantém um pH estomacal aproximadamente neutro na superfície das células epiteliais, agindo como um mecanismo de defesa físico que impede a ação da pepsina, enzimas proteolíticas e do ácido clorídrico (REPETTO; LLESUY, 2002; LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008).

Após a secreção ácida pelo estômago, uma camada de ácido se forma acima da barreira de muco-bicarbonato e ambas são imiscíveis devido à sua diferença de polaridade. Esse caráter hidrofóbico é responsável por impedir a difusão contrária do ácido, e dessa maneira evita a agressão à mucosa gástrica (ICHIKAWA *et al.*, 2000).

Os polissacarídeos sulfatados extraídos de algas apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura, e essas propriedades estão envolvidas de acordo com sua composição estrutural como: densidades de cargas, teor de sulfato, conformação da cadeia e peso molecular (PEREIRA *et al.*, 2005; FONSECA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008). Em adição, possuem como característica uma baixa toxicidade (TALARICO *et al.*, 2005). Dessa forma, o isolamento de novos polissacarídeos sulfatados torna-se importante para encontrar novas moléculas com propriedades farmacológicas, já que cada molécula dessas possui uma estrutura única, podendo atuar em alvos moleculares diferentes (COSTA *et al.*, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar uma fração polissacarídica da alga *Solieria filiformis* (PLS) e investigar sua possível propriedade antioxidante e protetora em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol.

### 2.2 Objetivos específicos

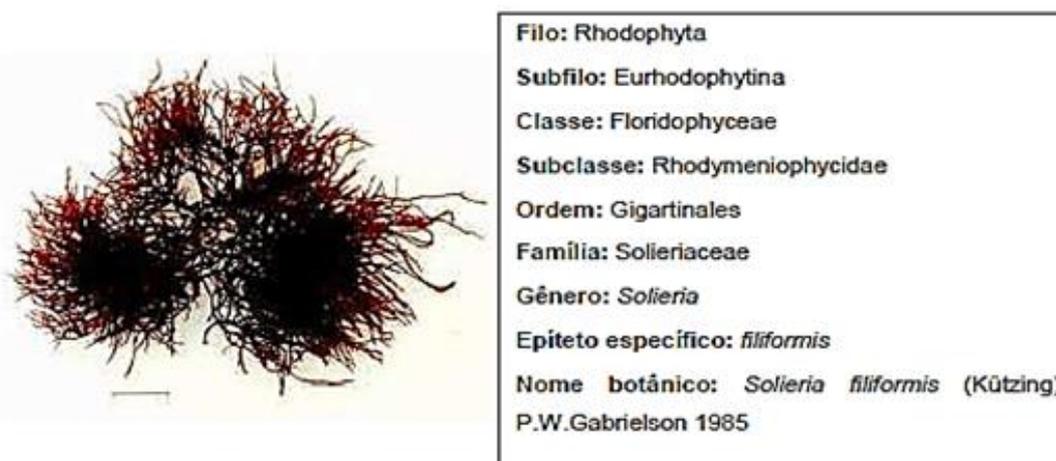
- ✓ Extrair frações polissacarídicas sulfatadas (PLS) hidrossolúveis da alga marinha *Solieria Filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson;
- ✓ Determinar a composição química do PLS através de métodos químicos e espectroscópicos;
- ✓ Determinar a estrutura química do PLS por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) e por ressonância magnética nuclear (RMN) de próton ( $^1\text{H}$ ) e carbono ( $^{13}\text{C}$ );
- ✓ Estimar a massa molar do PLS através de Cromatografia de Permeação em Gel (CPG);
- ✓ Analisar o efeito do PLS quanto a sua atividade antioxidante *in vitro*, realizando os testes de sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), quelação do íon ferroso e capacidade antioxidante total;
- ✓ Avaliar o efeito protetor do PLS em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol;
- ✓ Avaliar o efeito do PLS nos níveis de glutathiona (GSH), concentração de malondialdeído (MDA) e concentração de hemoglobina (Hb);

### 3. MATERIAIS

#### 3.1. Coleta e identificação da alga marinha

Os exemplares da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson (registrada sob o número 35.682 no herbário ficológico do Laboratório de Ciências do Mar – Labomar, Universidade Federal do Ceará) foram coletadas na praia de Pacheco, município de Caucaia, Ceará, Brasil, (coordenadas: 03° 43 '58' 'S, 38° 39' W 21 ") em setembro/2013 durante a maré baixa (-0,1 a 0,2m). Após a coleta, as algas foram transportadas em recipiente térmico em baixa temperatura para o Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). No laboratório, as algas foram lavadas com água corrente e separadas de epífitas e/ou outros organismos incrustantes. Por último, as algas foram novamente lavadas com água destilada e acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados e armazenadas em temperatura de -20°C, até posterior utilização. O aspecto macroscópico da alga e sua classificação taxonômica podem ser observados na Figura 7.

**Figura 7** - Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* e sua classificação taxonômica.



**Fonte:** *AlgaeBase*, 2011.

### 3.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas para a realização dos ensaios de efeito gastroprotetor do polissacarídeo sulfatado (PLS), da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*, em modelo de lesões gástricas induzidas por etanol.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, e receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os esforços foram realizados para minimizar o estresse e sofrimento dos animais utilizados.

Todos os animais foram mantidos em jejum de dezoito a vinte e quatro horas antes das realizações dos experimentos, mas com acesso a água. Os ensaios realizados seguiram os princípios éticos, a biossegurança e o respeito da experimentação animal e foram aprovados pelo comitê de ética sob o número 0068/14.

### 3.3 Soluções e reagentes

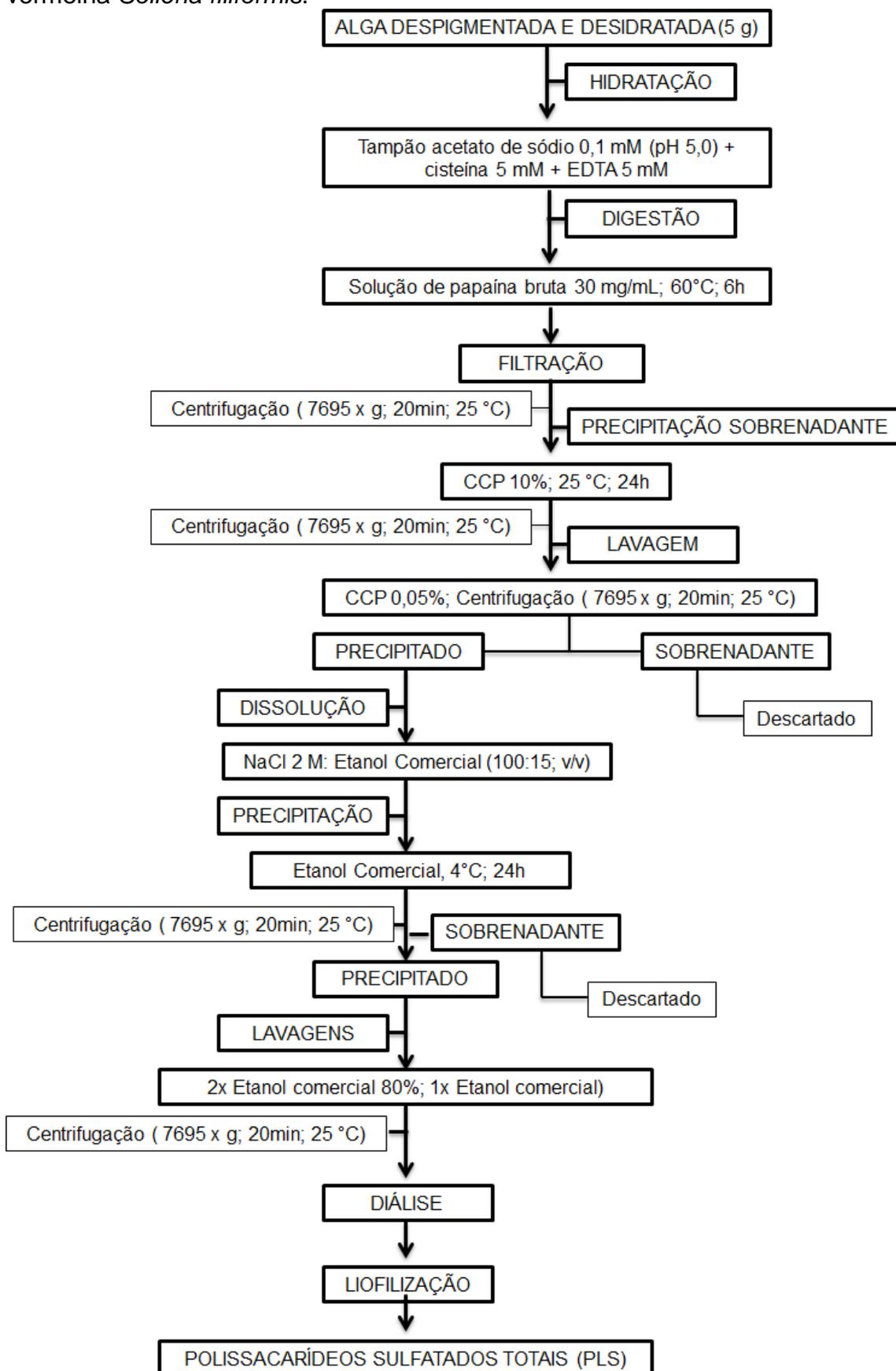
Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. Os reagentes e soluções utilizados foram: 5,5-dinitro-bis (ácido 2-nitrobenzóico), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS), acetato de sódio, ácido ascórbico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, água deuterada, albumina sérica bovina, álcool etílico, álcool terc-butilíco, álcool metílico, cisteína, cloreto de cetilpiridínio, cloreto de potássio, comassie G-250, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), etanol comercial, ferrozina (ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p-p'-disulfônico), ácido fórmico, fosfato de sódio, galactose, corante hematoxilina e eosina, hexadecitrimetilamônio (HTAB), hidróxitolueno butilado (BHT), molibdato de amônio, nitrogênio líquido, nitrato de sódio, n-butanol, o-dianisidina, papaína bruta, peróxido de hidrogênio, cloreto de sódio, solução salina, sulfato ferroso.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Extração e purificação do polissacarídeo sulfatado (PLS)

O mecanismo de extração da fração polissacarídica sulfatada (PLS) da alga marinha *Solieria filiformis* foi realizado de acordo com Farias *et al.* (2000), com algumas modificações. Primeiramente a alga foi despigmentada em recipiente com água e exposta a insolação, em seguida desidratada em temperatura ambiente e macerada com nitrogênio líquido. A alga macerada (5g) foi colocada em contato com 250mL do tampão de extração acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM e digerida com 510 mg de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL) durante 6 horas a 60°C em banho-maria. A temperatura do banho-maria foi aferida a cada 30 minutos. Em seguida, o material foi filtrado em malha fina e centrifugado (7965 x g; 20 min; 25 °C). Os polissacarídeos presentes no sobrenadante do material centrifugado foram precipitados através da adição de 16 mL de uma solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CCP) mantido por 24 horas a 25° C. Logo após a precipitação, o material foi novamente centrifugado (7965 x g; 20 min; 25 °C) e o sobrenadante descartado. O extrato precipitado do PLS foi lavado com 200mL de solução a 0,05% de CCP, centrifugado (7965 x g; 20 min; 25 °C), e depois dissolvido em 174mL de solução NaCl 2 M : etanol comercial (100:15; v/v). O PLS foi novamente precipitado com adição de 200 mL etanol comercial por 24 h a 4°C. Após a precipitação, o material foi centrifugado (7965 x g; 20 min; 25 °C) e submetido a duas lavagens com 200 mL etanol comercial diluído a 80% e uma vez com 200 mL etanol comercial, seguido de centrifugação (7965 x g; 20 min; 25 °C). O PLS assim obtido foi dialisado exaustivamente contra água destilada e liofilizado. A figura 8 esquematiza a extração do PLS da alga marinha *Solieria filiformis*.

**Figura 8** - Esquema de extração da fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.



## 4.2 Rendimento

Para cálculo do rendimento da fração obtida em relação ao peso de alga utilizado para a extração foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de polissacarídeos \%} = \frac{\text{massa (g) do material seco obtido}}{\text{massa (g) de macroalga seca utilizada para o processo de extração}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

## 4.3 Análises químicas e estruturais

### 4.3.1 Determinação do conteúdo de carboidratos

A determinação dos carboidratos totais foi realizada seguindo o método do Ácido Sulfúrico – UV (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013). Brevemente, foram utilizadas soluções de 1 mg.mL<sup>-1</sup> de polissacarídeos sulfatados diluídos em água destilada na proporção de 1:50 e 1:80. A partir dessas soluções diluídas, 1 mL foi adicionado rapidamente a 3 mL de ácido sulfúrico e agitados por 30 segundos. A temperatura da mistura subiu rapidamente dentro de 10 a 15s após a adição de ácido sulfúrico. Em seguida, a solução foi colocada em banho de gelo por 2 min até estabelecer a temperatura ambiente. Finalmente foi realizada a leitura de absorbância a 315 nm em um espectrofotômetro ultravioleta (UV). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A quantificação do PLS foi realizada a partir de uma curva de calibração de concentrações crescentes de galactose (10 a 90 µg de galactose).

### 4.3.2 Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes

O conteúdo de proteínas contaminantes foi realizado através do método proposto por Bradford (1976).

A solução de Bradford foi realizada da seguinte maneira: 50,0 mg de Comassie G-250 foram dissolvidos em 25,0 mL de álcool etílico e agitada durante 1 h em

erlenmeyer envolto com papel alumínio. Em seguida, adicionaram-se 50,0 mL de ácido fosfórico 85%. O volume foi então aferido em balão volumétrico de 500 mL com uso de água destilada. A solução resultante foi filtrada três vezes com papel de filtro na ausência de luz e armazenada em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Foi realizada a confecção de uma curva padrão com Albumina Sérica Bovina (BSA) através da mistura de 1,0 mL de Solução de BSA em diferentes concentrações (5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) com 2,5 mL de solução de Bradford. Após 10 min, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro (SPECTRONIC INSTRUMENTS, modelo SPECTRONIC<sup>®</sup> 20 GENESYS<sup>™</sup>) em um comprimento de onda de 595 nm. Todas as concentrações foram analisadas em triplicatas.

Para quantificar o teor de proteínas das amostras, foram utilizadas soluções de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de polissacarídeos diluídas na proporção 1:10, 1:50 e 1:100. A partir dessas soluções diluídas, 1 mL foi adicionado a 2,5 mL de solução de Bradford e após 10 min foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 595 nm. Todas as concentrações foram testadas em triplicata.

A estimativa das concentrações de proteínas foi realizada através da correlação entre as leituras obtidas com as soluções contendo as amostras e as da curva padrão de BSA.

#### **4.3.3 Determinação do conteúdo de sulfato e carbono**

O teor de sulfato livre e carbono na fração polissacarídica extraída foram determinados por microanálise elementar (Equipamento Perkin-Elmer CNH 2400). O grau de sulfatação foi determinado de acordo com método descrito por Melo *et al.* (2002), a partir dos percentuais de carbono (%C) e enxofre (%S) obtidos.

O método de quantificação baseado na equação abaixo é possível através da estrutura dos polissacarídeos, que são formados por dissacarídeos contendo um  $\beta$ -D-galactopiranosose (Unid A) com outro  $\alpha$ -D-galactopiranosose ou 3,6-anidrogactose (Unid B), considerando que o teor de sulfatação é definido como o número de  $\text{OSO}_3$ , ou átomos de enxofre, por unidade dissacarídica repetitiva, com 12 átomos de carbono. Logo, o número 12 multiplicado pela massa atômica do carbono corresponde ao número de carbono por unidade dissacarídica.

$$\text{Teor de sulfato}\% = \frac{\frac{S\%}{\text{massa atômica do S}}}{\frac{C\%}{\text{massa atômica do C} \times 12}} = 4,5x \left(\frac{S\%}{C\%}\right) \quad \text{Eq. (2)}$$

#### **4.3.4 Cromatografia de permeação em gel**

A massa molar do pico do polissacarídeo (MPK, molar mass of peak) foi estimada por cromatografia de permeação em gel (GPC) com concentração de 0,5 % de polissacarídeo e 0,1 M de NaNO<sub>3</sub> como solvente. A cromatografia ocorreu em equipamento Shimadzu à temperatura ambiente usando uma coluna Ultrahydrogel linear (7,8 x 300 mm), com fluxo de 0,5 ml/min, com auxílio de detectores de índice refração (RID) e ultravioleta (UV-VIS) a 254 nm. O volume de eluição foi corrigido para o marcador interno de etilenoglicol a 11,25 mL. Amostras de pululano (Shodex Denko) Mw de 5,9 × 10<sup>3</sup>, 1,18 × 10<sup>4</sup>, 4,73 × 10<sup>4</sup>, 2,12 × 10<sup>5</sup>, 7,88 × e 10<sup>5</sup> g/mol foram usadas para a confecção da curva padrão.

#### **4.3.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho**

Os espectros do polissacarídeo 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 Shimadzu, modelo FTIR-8300, apresentando uma janela espectral de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.3.6 Ressonância magnética nuclear**

A ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C é um método bastante eficiente para analisar a estrutura de polissacarídeos de algas. Os espectros de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H de RMN foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da UFC em espectrômetro Bruker Avance DRX 500. O PLS da alga marinha *Solieria filiformis* foi dissolvido em água

deuterada (D<sub>2</sub>O) a 2,5% m/v. A análise do PLS foi realizada a 60 °C por 12 horas, utilizando 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) como padrão interno (0,00 ppm por <sup>1</sup>H).

#### 4.4 Sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

O sequestro do radical livre 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) foi analisado de acordo com o método descrito por Blois (1958), com algumas modificações. Primeiramente, 300 µL da amostra do PLS em várias concentrações (0,1 – 4 mg.mL<sup>-1</sup>) foram dissolvidas e agitadas em 200 µL de metanol (MeOH). Em seguida, nessa solução foram adicionados 2,5 mL de DPPH (75 µM em MeOH) e mantidas em temperatura ambiente no escuro por 30 min. As leituras de absorbâncias foram realizadas a 517 nm (A<sub>517</sub>). Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

O efeito no sequestro do radical livre DPPH (%) foi calculado através da seguinte fórmula:

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

Em que, A<sub>0</sub>= A<sub>517</sub> do DPPH sem amostra; A=A<sub>517</sub> da amostra e DPPH; e A<sub>b</sub>=A<sub>517</sub> da amostra sem DPPH.

#### 4.5 Ensaio de quelação do íon ferroso

O ensaio de quelação do íon ferroso foi analisado de acordo com o método descrito por Chew *et al.*, (2008), com algumas modificações. Nesta ordem, misturou-se 1 mL de Sulfato Ferroso 0,1 mM (FeSO<sub>4</sub>), 1 mL de amostra (PLS 0,1 – 4 mg.mL<sup>-1</sup>) e 1 mL de Ferrozina 0,25 mM (ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p-p'-disulfônico). Os tubos foram agitados por 1 minuto e após 10 min foram realizadas as leituras a 562 nm. O branco é realizado substituindo-se a amostra pelo solvente utilizado para todas as amostras (água destilada). EDTA foi utilizado como material de referência. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

Os resultados foram expressos como habilidade de quelação do íon ferroso (%) e calculados através da seguinte fórmula:

$$\text{Habilidade de quelação do íon Ferroso (\%)} = [A_0 - (A - A_b)/A_0] \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que,  $A_0 = A_{562}$  do  $\text{FeSO}_4$  e Ferrozina sem amostra;  $A = A_{562}$  da amostra,  $\text{FeSO}_4$  e Ferrozina; e  $A_b = A_{562}$  da amostra sem  $\text{FeSO}_4$  e Ferrozina.

#### 4.6 Ensaio de capacidade antioxidante total pela formação do complexo fosfomolibdênio

O ensaio de capacidade antioxidante foi realizado através da formação do complexo fosfomolibdênio descrito por Prietro, Pineda e Aguilar (1999). Brevemente, adiciona-se 300  $\mu\text{L}$  da amostra (PLS 0,1 – 4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a 3 mL de solução de molibdato de amônio 4 mM, ácido sulfúrico 0,6 M e fosfato de sódio 28 mM, homogeneizar e incubar a 95 °C durante 90 min. Após o resfriamento foram realizadas as leituras a 695 nm. O branco é feito substituindo-se a amostra pelo solvente utilizado para todas as amostras. O BHT foi utilizado como material de referência. Para efeito de cálculo, o ácido ascórbico (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi considerado como 100% de atividade antioxidante. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante total (%) e calculados através da seguinte fórmula:

$$\text{Capacidade antioxidante total (\%)} = \left[ \frac{(A_{695\text{nm amostra}} - A_{695\text{nm branco}}) \times 100}{A_{695\text{nm ác ascórbico}} - A_{695\text{nm branco}}} \right] \quad \text{Eq. (5)}$$

## **4.7 Lesões gástricas induzidas por etanol**

### **4.7.1 Efeito do polissacarídeo sulfatado em lesões gástricas induzidas por etanol**

Camundongos *Swiss* fêmeas (n=6) foram colocados em jejum 18-24 h, em seguida, foram inicialmente tratados com o polissacarídeo da alga *S. filiformis* (PLS 0.3, 1, 3 e 10 mg.Kg<sup>-1</sup>) por gavagem. Após 30 min do tratamento, as lesões gástricas foram induzidas pela administração de etanol 50% (0,5 mL/25g, v.o), como descrito por Robert (1979) com algumas modificações. Os grupos controles receberam apenas solução salina ou salina + etanol 50%. Após 1 hora da administração do etanol, os animais foram sacrificados e seus estômagos rapidamente removidos e abertos ao longo da grande curvatura, lavados com solução salina e estirados sobre uma superfície plana com auxílio de alfinetes. Imagens digitais foram capturadas com um referencial métrico para posterior análise macroscópica das lesões (lesões hemorrágicas ou ulcerativas) usando um programa de computador planimétrico (Image J<sup>®</sup>) (MEDEIROS *et al.*, 2009).

Amostras dos estômagos foram coletadas para posteriores dosagens bioquímicas de glutatona, malondialdeído e hemoglobina, que são parâmetros importantes na lesão gástrica por etanol.

## **4.8 Níveis de glutatona (GSH) na mucosa gástrica dos animais**

As concentrações de glutatona (GSH) das amostras de tecidos foram estimadas de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Um segmento do tecido foi homogeneizado em solução gelada de 0,02 M EDTA (1 ml/100 mg de tecido). Alíquotas de 400 µL de tecido homogêneo foram misturadas com 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloroacético 50% (w/v) em tubos de vidro e centrifugados a 3.000 rpm por 15 min. Em seguida, 400 µL de cada sobrenadante foi misturado com 800 µL de tampão Tris (0,4 M, pH 8,9) e 20 µL de 0,01 M 5,5-dinitro-bis (ácido 2-nitrobenzóico). Subsequentemente, as amostras

foram agitadas por 3 minutos e realizada as leituras em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram expressos como microgramas de GSH por grama de tecido.

#### **4.9 Concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica dos animais**

Os níveis de malondialdeído de cada grupo foram analisados usando o método descrito por Mihara e Uchiyama (1978), que se baseia na reação com o ácido tiobarbitúrico. Fragmentos de tecidos pesados entre 100 e 150 mg foram homogeneizados com solução gelada de cloreto de potássio 1,15%. Brevemente, 250 µL de cada amostra foram adicionados a 1,5 mL de ácido fosfórico 1% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e 0,5 mL de álcool terc-butilíco 0,6% (solução aquosa). Então, essa mistura foi homogeneizada e aquecida em água fervente por 45 minutos. A mistura foi então resfriada imediatamente em água gelada seguida pela adição de 4 ml de n-butanol. Essa mistura foi agitada e a camada de butanol retirada por centrifugação a 1200x g por 10 minutos. A densidade óptica foi determinada em 535 e 520 nm, e as diferenças da densidade óptica entre as duas determinações foram calculadas com o valor do álcool terc-butilíco. Os resultados foram expressos em nanomoles por grama de tecido (nmol/g).

#### **4.10 Quantificação dos níveis de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica dos animais**

Para quantificação dos níveis de hemoglobina, em que sua presença indica hemorragia, foi utilizado o método cianometahemoglobina. Esse método baseia-se na oxidação do ferro II da molécula de hemoglobina pelo ferricianeto, que se combina com o cianeto ionizado para produzir o cianeto hemoglobina, proporcionando uma coloração avermelhada proporcional a concentração de hemoglobina na amostra, no qual é medido em 540 nm.

No trabalho foi utilizado um kit padrão para hemoglobina (LABTEST, Diagnóstico AS, Minas Gerais, Brasil), contendo o reagente de cor para detecção de hemoglobina (reagente de Drabkin), com algumas modificações de acordo com Medeiros *et al.* (2008). Brevemente, o tecido foi macerado (1 mL reagente de cor

para 100 mg de tecido gástrico) com o reagente de cor, em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, o sobrenadante filtrado com filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. A concentração de hemoglobina/100 mg de tecido foi determinada a partir da curva padrão de hemoglobina, sendo as dosagens realizadas em leitora de microplaca com absorvância de 540 nm. Os resultados foram expressos em mg de Hb/g de tecido.

#### **4.11. Análise estatística**

Os dados foram avaliados através do teste estatístico ANOVA para análise de variância. Quando houve diferença estatística entre os grupos, foi então realizado o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M ou mediana com mínimo e máximo, sendo  $p < 0,05$  utilizado como estatisticamente significativo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração e rendimento do PLS

Neste trabalho, foi realizada a extração de frações polissacarídeos sulfatadas através de digestão enzimática com papaína. A partir de 5 g de massa seca da alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson foram recolhidos 1,065 g de PLS, correspondendo a um rendimento de 21,3%. Esse rendimento é semelhante aos obtidos por Araújo *et al.* (2011), Assreuy *et al.* (2010) e Pontes *et al.* (2009), que obtiveram para a mesma espécie de alga rendimentos de 19,14%, 25% e 24%, respectivamente. Esses resultados demonstram que a *S. filiformis* apresenta alto rendimento na extração enzimática de polissacarídeos.

O rendimento obtido nesse estudo se enquadra a valores encontrados para outras espécies de algas marinhas vermelhas da costa brasileira, que apresentam rendimento variando de 2,4 a 46%. Vários fatores podem afetar o rendimento de polissacarídeos presentes nas algas, como a espécie, a metodologia utilizada para a extração, fatores fisiológicos, estágio de vida, variações sazonais e mesmo o local de origem dos espécimes (MARINHO-SORIANO; BOURRET 2003.; ROMERO; VILLANUEVA; MONTAÑO, 2008).

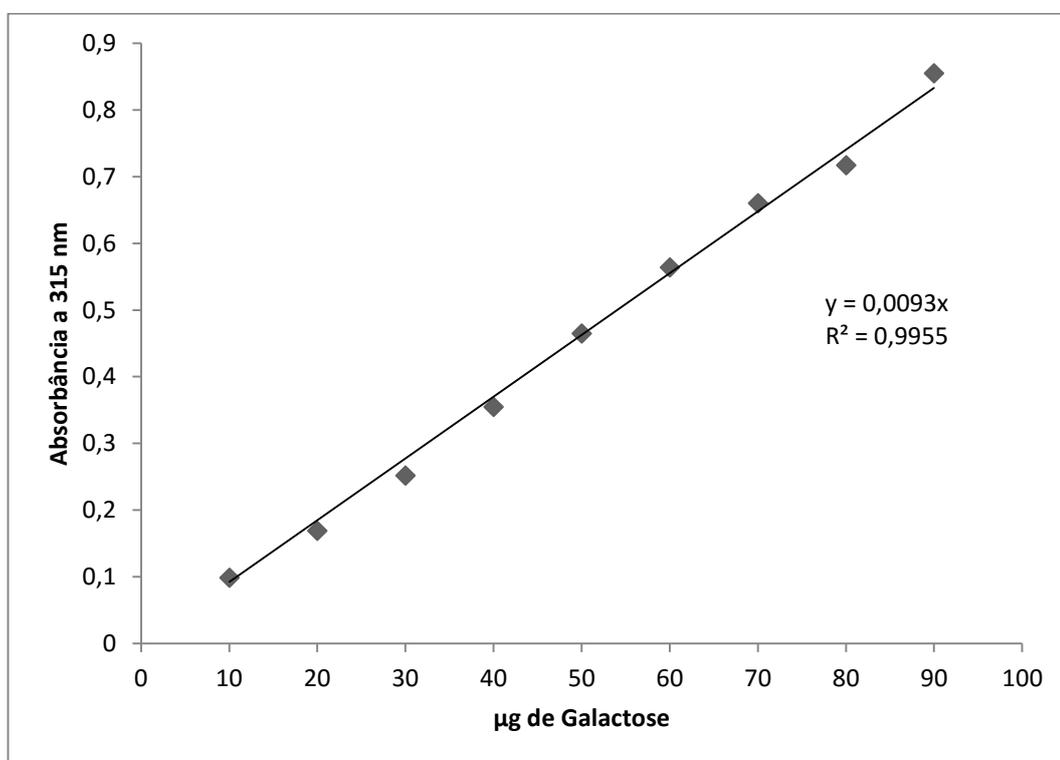
Esses fatores, especialmente variação sazonal, podem explicar a diferença de rendimento obtido nesse estudo para o rendimento de extração enzimática obtida por Araújo *et al.* (2011) para os PLS de *Solieria filiformis*. A variação no método de extração também interfere no rendimento final dos polissacarídeos, como foi observado no trabalho de Stephanie *et al.* (2010) que obtiveram um rendimento de 14,6% de polissacarídeo a partir de uma extração aquosa a 85°C de *Solieria chordalis*.

## 5.2 Análises químicas e estruturais

### 5.2.1 Determinação do conteúdo de carboidratos

A curva de calibração obtida com o padrão de galactose, para a determinação da quantidade de açúcares (galactose) é observado na figura 9.

**Figura 9** – Curva padrão para a estimativa da concentração de carboidratos.



A composição química de galactose dos PLS liofilizados de *S. filiformis* correlacionadas com a curva de calibração, apontam para um percentual de 66.0%. Esse dado foi superior ao encontrado por Lima (2012), que obteve um teor de 50.5% de carboidratos, em espécimes da mesma alga coletadas no mesmo período do ano neste trabalho. No estudo realizado por Araújo *et al.* (2011), o teor de galactose do polissacarídeo (29,21%) foi muito inferior ao encontrado nesse estudo, porém devemos destacar que a metodologia de quantificação dos carboidratos utilizadas por Lima (2012) e Araújo (2011) baseia-se no método de Dubois *et al.* (1956).

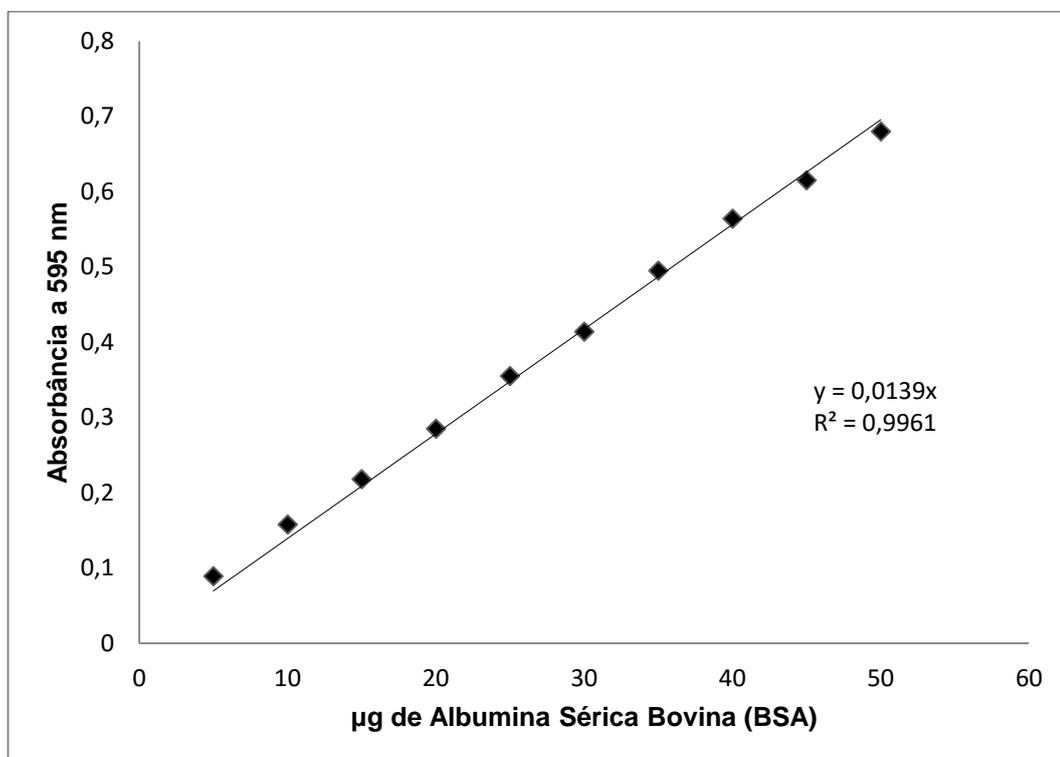
Silva *et al.* (2010) analisaram os teores de carboidrato de três carragenanas comerciais (iota, kappa e lambda-carragenana) que apresentaram 64,5%, 60,26% e 61,20%, respectivamente, concordando com os nossos resultados.

A variação na quantidade de carboidrato entre uma mesma espécie pode ser decorrente de variações sazonais ou geográficas (PEREIRA *et al.*, 2005). Além disso, as condições experimentais utilizadas na determinação dessas moléculas também podem ocasionar variações na composição química destes compostos (RODRIGUES *et al.*, 2011).

### 5.2.2 Determinação do conteúdo de proteínas contaminantes

A curva de calibração obtida com o padrão de albumina sérica bovina (BSA) e o reagente de Bradford para a determinação da quantidade de proteína presentes na amostra é apresentada na figura 10.

**Figura 10** – Curva padrão para a estimativa da concentração de proteínas.



As leituras de absorvência de proteínas das soluções contendo os PLS ficaram abaixo do poder de detecção do espectrofotômetro utilizado, o que demonstra que o material obtido pela extração enzimática possui apenas traços proteicos.

### 5.2.3. Determinação do conteúdo de sulfato e carbono

O conteúdo de sulfato e percentual de carbono do PLS da alga *S. filiformis* foram realizados através da microanálise elementar. A amostra de PLS apresentou 6,5% de enxofre e 27,22% de carbono, permitindo assim calcular o grau de sulfatação (tabela 1) do material através da equação 2, que resultou em um valor de 1,08.

**Tabela 1** –Rendimento e análise os PLS extraídos da alga *Solieria filiformis*.

Amostra	Rendimento <sup>a</sup> (%)	S <sup>b</sup> (%)	C <sup>b</sup> (%)	Grau de Sulfatação	Proteína <sup>c</sup> (%)
PLS	21,3	6,50	27,22	1,08	Traços

<sup>a</sup>Rendimento obtido a partir de 5g de alga seca;

<sup>b</sup>Determinado por microanálise elementar;

<sup>c</sup>Determinado pelo método de Bradford (1976).

O grau de sulfatação baseia-se de acordo com a estrutura dos polissacarídeos, que são formados por unidades dissacarídicas contendo uma unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose (Unid A) com outra unidade de  $\alpha$ -D-galactopiranosose ou 3,6-anidrogactose (Unid B), em que o teor de sulfatação é definido como o número de  $\text{OSO}_3^-$ , ou átomos de enxofre, por unidade dissacarídica repetitiva. Então, o resultado encontrado através da microanálise elementar (1,08) corrobora com os resultados encontrados pelo espectro do infravermelho (figura 12), mostrando que o PLS da alga *Solieria filiformis* possui um elevado grau de sulfatação, com mais de uma unidade de  $\text{OSO}_3^-$  por unidade dissacarídica.

Araújo *et al.* (2011) observaram em seu estudo com os mesmos polissacarídeos sulfatados de *S. filiformis* um conteúdo de sulfato livre de 27,75%,

utilizando o método de hidrólise ácida em ácido clorídrico descrito por Dodgson & Price (1962). Esse dado está de acordo com o nosso, demonstrando que os polissacarídeos da alga *S. filiformis* possui um alto teor de sulfatação em sua estrutura química.

#### **5.2.4 Cromatografia de permeação em gel**

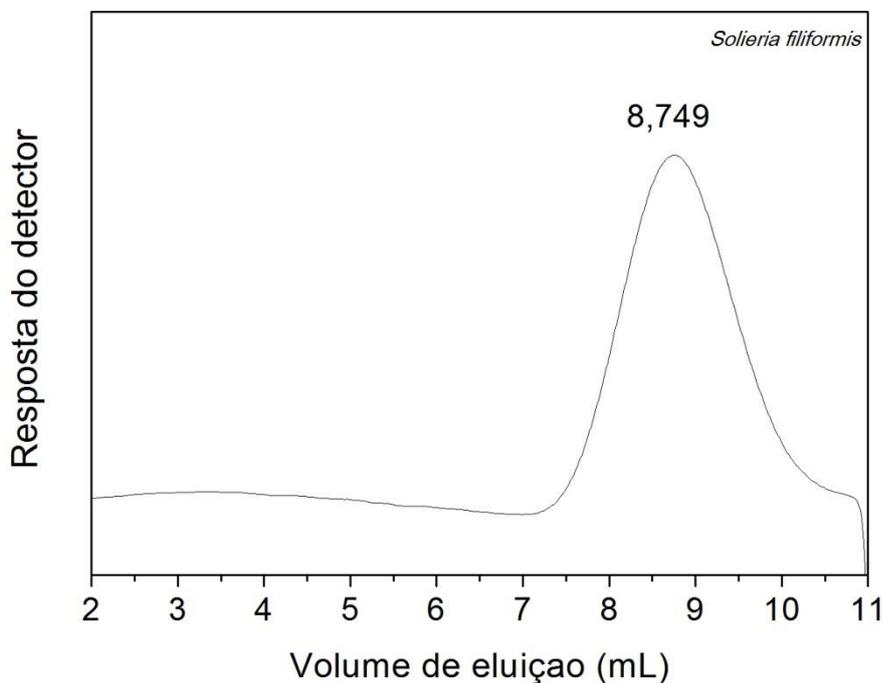
Os polissacarídeos são polímeros que não apresentam massas molares precisamente definidas. Dessa maneira os polissacarídeos exibem massas molares médias. Isso acontece devido ao fato desses compostos serem polidispersos, apresentando uma distribuição de espécies bastante semelhantes em sua estrutura molecular, porém com variação no tamanho da cadeia polissacarídica (STEPHEN, 1995).

A distribuição de massas molares do PLS extraído da alga *Solieria filiformis* foi estimada através da cromatografia de permeação em gel (CPG). Foram utilizadas pululanas, homopolissacarídeos lineares neutros isolados do fungo *Aureobasidium pullulans* (LEATHERS, 2003) de diferentes massas molares, em intervalo de grandeza de  $10^3$  a  $10^6$  g/mol, para a construção da curva de calibração.

O perfil cromatográfico do PLS da alga *S. filiformis* é apresentado na figura 11. O cromatograma mostra um único pico com volume de eluição de 8,749 mL no seu ápice, comportando-se como um sistema pouco polidisperso. A massa molar do pico foi estimada em 210,9kDa. Valores elevados para peso molecular são comuns em polissacarídeos sulfatados de algas marinhas (POMIN, 2010).

Polissacarídeos sulfatados provindos de algas marinhas, com peso molecular acima de 100 kDa tem sido descrito constantemente na literatura (LAHAYE, 2001; MURANO *et al.*, 1992; RODRIGUEZ *et al.*, 2009; TASHIRO *et al.*, 1996). Barros *et al.* (2013) e Souza *et al.* (2012) caracterizando polissacarídeos do tipo agaranas das algas marinhas *Gracilaria caudata* e *Gracilaria birdiae*, respectivamente, encontraram polissacarídeos distribuídos entre 250 kDa a 370 kDa.

**Figura 11** - Perfil cromatográfico do PLS extraído da alga *Solieria filiformis* em cromatografia de permeação em gel (GPC).



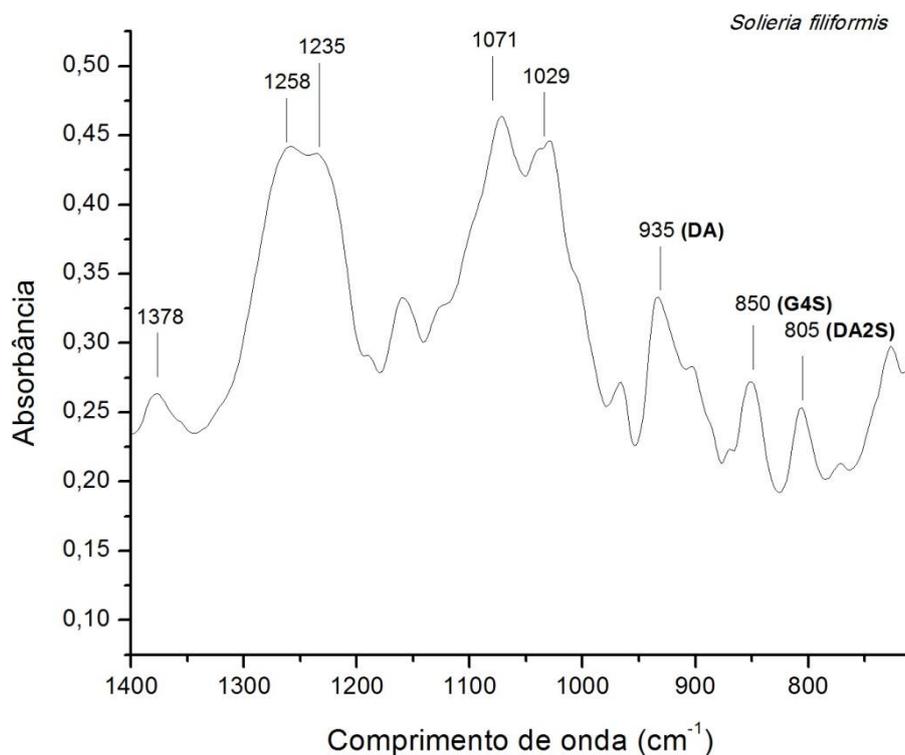
### 5.2.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) é uma técnica bastante utilizada para caracterização estrutural de compostos químicos, principalmente naturais. Além de necessitar de pequenas quantidades de amostras (miligramas), essa técnica é um método não agressivo, rápido e de alta confiabilidade, bastante útil na identificação de componentes estruturais de polissacarídeos (PEREIRA *et al.*, 2011).

O FT-IR permite sugerir atribuições estruturais características de compostos químicos. O espectro de infravermelho de uma determinada molécula é bastante característico e pode ser utilizado como uma assinatura química para a mesma (SOLOMONS; FRYHLE, 2006).

O espectro de FT-IR obtido nesse estudo para o PLS da alga marinha *S. filiformis* está mostrado na figura 12, e a tabela 2 indica as atribuições dadas às bandas obtidas.

**Figura 12** - Espectro de FT-IR em pastilhas de KBr do PLS extraído da alga *Solieria filiformis* na região entre 1400 – 700  $\text{cm}^{-1}$ .



O espectro de infravermelho do PLS da alga deste estudo apresentou perfis de bandas características, as quais são relacionadas com polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, com presença de sinais intensos indicativos de carragenanas. As diferenças encontradas entre lambda-, kappa- e iota-carragenana são devido à localização e o número dos grupos de éster-sulfato nas estruturas químicas dos polissacarídeos (CAMPO *et al.*, 2009).

O espectro (Figura 12) apresentou bandas em torno de 935, 850 e 805  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença de 3,6-anidrogactose,  $\beta$ -D-gactose-4-sulfato e 3,6-anidrogactose-2-sulfato, respectivamente (GÓMES-ORDÓNES; RUPÉREZ, 2011). Essas bandas são características de iota-carragenana, diferindo da kappa-carragenana por apresentar no espectro a banda característica (805  $\text{cm}^{-1}$ ) de 3,6-anidrogactose-2-sulfato, presente apenas em carragenanas do tipo iota (PEREIRA; RIBEIRO-CLARO, 2014).

Knutsen *et al.* (1994) atribuíram uma nomenclatura através de códigos com a finalidade de facilitar o estudo desses compostos. As três principais formas de carragenana foram nomeadas com os seguintes códigos: G4S-DA2S, G4S-DA e G2S-D2S,6S para iota-, kappa- e lambda-carragenana, respectivamente.

**Tabela 2** - Atribuições às bandas obtidas em experimentos de infravermelho.

Número de ondas (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Carragenanas		
		<i>Kappa</i>	<i>Iota</i>	<i>Lambda</i>
1380-1355	Sulfato	+	+	+
1250-1230	O=S=O	+	+	+
1190	S=O	+	+	-
1080-1040	C-O + C-OH	+	+	+
1026	S=O em C <sub>2</sub>	-	+	+
930	C-O-C (3,6-anidrogactose)	+	+	-
900-890	Grupo C6 da β-D-gactose	+	+	+
850-840	C-O-S em C4 da gactose	+	+	-
805-800	C-O-S em C2 de 3,6-anidrogactose	-	+	-

Fonte: adaptado de PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003

As bandas encontradas em 1378, 1258 e 1235 cm<sup>-1</sup> são atribuídas à presença de grupos éster de sulfato. A elevada intensidade das bandas 1258 e 1235 cm<sup>-1</sup> sugerem que o PLS possui um considerado grau de sulfatação, confirmado pela dosagem de sulfato (Tabela 2) (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; ROCHAS, LAHAYE; YAPHE, 1986). Os esqueletos de galactanas são atribuídos às bandas 1071 e 1029 cm<sup>-1</sup> (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

Em estudo realizado com *Mastocarpus stellatus* por Gómez-Ordóñez, Jiménez-Escrigue, Rupéres (2014) com frações polissacarídicas, mostrou absorção em bandas características (930, 845 e 805 cm<sup>-1</sup>) de iota-carragenanas padrões. Murano *et al.* (1997) trabalhando com um polissacarídeo também extraído da alga *S. filiformis*, observaram no espectro de infravermelho, que o PLS possui bandas em torno de 930, 850 e 805 cm<sup>-1</sup>, que também foram caracterizadas pelo espectro obtido nesse trabalho.

### 5.2.6 Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) foi utilizada para avaliar a estrutura química do PLS extraído da alga *Solieria filiformis*. Os espectros gerados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  são representados na figura 13.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 13A) revelou a presença de um polissacarídeo sulfatado com estrutura do tipo iota – carragenana. A região anomérica apresentou dois picos, os quais foram assinalados baseados na literatura como C-1 de  $\beta$ -D-galactose-4-sulfato (G4S) em  $\delta$  102.6 e C-1 de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose-2-sulfato (DA2S) em  $\delta$  92.5 (BATISTA *et al.*, 2014; VAN DE VELDE *et al.*, 2002; MURANO *et al.*, 1997). A tabela 3 mostra os assinalamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para o polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Solieria filiformis*.

**Tabela 3** -Assinalamentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o PLS da alga *Solieria filiformis*.

Carragenana	Unid <sup>a</sup>	$^{13}\text{C}$ deslocamento químico (ppm)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
lota	G4S	102.6	69.9	77.4	72.4	75.3	61.8
	DA2S	92.5	75.5	78.4	78.7	77.7	69.9

<sup>a</sup>nomenclatura proposta por Knutsen *et al.*, 1994.

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 13B) revelou a presença de dois sinais anoméricos em  $\delta$  5.3 e  $\delta$  4.64, correspondendo ao H-1 de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose-2-sulfato e H-1 de  $\beta$ -D-galactose-4-sulfato (G4S) (KRAVCHENKO *et al.*, 2014; COSENZA *et al.*, 2014; VILLANUEVA; MONTANO, 2003). A tabela 4 mostra os assinalamentos químicos de  $^1\text{H}$  para o polissacarídeo sulfatado da alga em questão.

**Tabela 4** - Assinalamentos de RMN de  $^1\text{H}$  para o PLS da alga *Solieria filiformis*.

Carragenana	Unid <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ deslocamento químico (ppm)
		H-1
lota	G4S	4.64
	DA2S	5.30

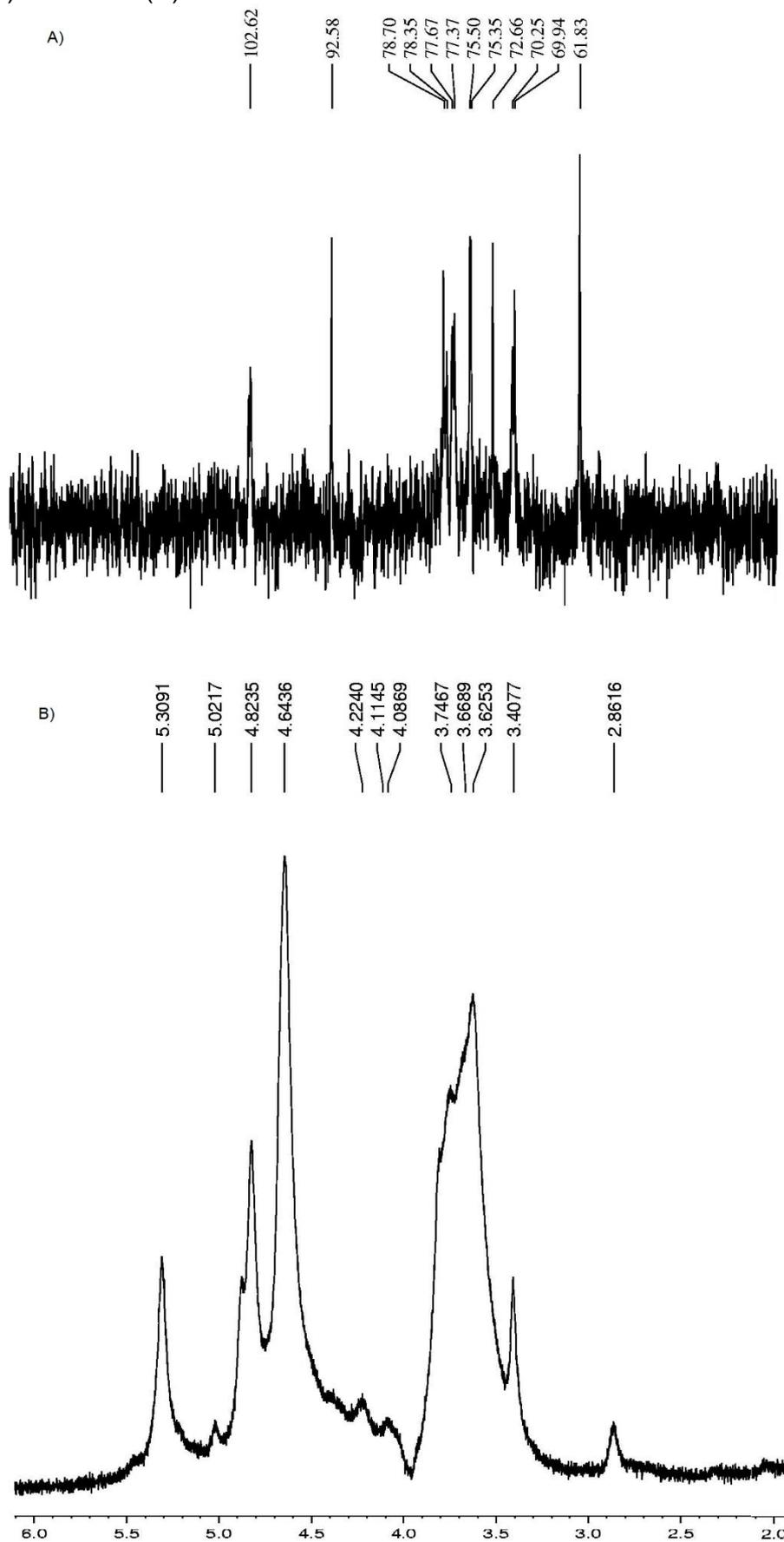
<sup>a</sup>nomenclatura proposta por Knutsen *et al.*, 1994.

Os resultados encontrados na análise de RMN coincidem integralmente aos achados obtidos a partir do polissacarídeo de *S. Filiformis* por espectroscopia de infra-vermelho (FT-IR) com transformada de Fourier (Figura 12). O espectro de FT-IR demonstrou a presença de três bandas características de iota-carragenana em 935, 850 e 805  $\text{cm}^{-1}$ , correspondendo a C – O – C de 3,6-anidrogactose, éster de sulfato em C-4 de  $\beta$ -D-galactose e sulfatação em C-2 da unidade 3,6-anidrogactose (VILLANUEVA, MONTANO, 2003; PEREIRA, RIBEIRO-CLARO, 2014). Nenhum assinalamento químico correspondente a kappa – carragenana foi encontrado nas análises de RMN. Neste caso, assinalamentos químicos típicos são obtidos em deslocamentos químicos de  $\delta$  95 para  $^{13}\text{C}$  e  $\delta$  5.1 para  $^1\text{H}$  (BATISTA *et al.*, 2014; KRAVCHENKO *et al.*, 2014; COSENZA *et al.*, 2014).

A técnica de RMN é muito sensível para a identificação de galactanas sulfatadas presentes em algas marinhas. Ela é uma ferramenta padrão para determinação de estruturas químicas de amostras de carragenanas, utilizada na indústria e por pesquisadores com diferentes abordagens correspondentes a diferentes objetivos ou interesses (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

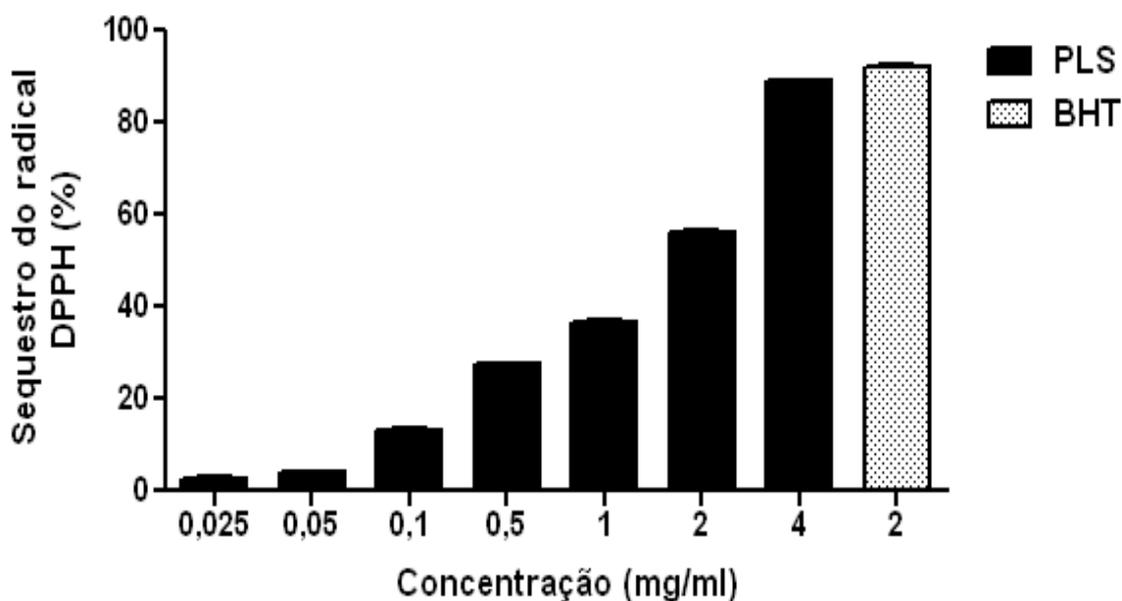
Batista *et al.* (2014) realizaram o estudo estrutural do polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Agardhiella ramosíssima* da família Solieriaceae, e obtiveram nos seus resultados espectros de infravermelho e RMN representativos de iota-carragenana, com perfis semelhantes aos obtidos para alga *S. filiformis*.

**Figura 13** -Espectros de RMN do PLS extraído da alga *Solieria filiformis* em solução de D<sub>2</sub>O; (A) <sup>13</sup>C RMN (B) <sup>1</sup>H RMN.





**Figura 15** - Efeito do sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) do PLS extraído da alga *Solieria filiformis*. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=3).



Foi utilizado como controle do ensaio o composto antioxidante hidroxitolueno butilato (BHT), que obteve uma  $IC_{50}$  de 0,47 mg/mL, essa concentração é bem menor do que a encontrada no PLS ( $IC_{50}$  de 1,77 mg/mL). Porém, esse composto de origem sintética, tradicionalmente utilizado na indústria farmacêutica possui limitações, devido às suspeitas de ser causador de danos às células hepáticas e também demonstrar elevado potencial carcinogênico (CHENG *et al.*, 2013; KUMAR, GANESAN, SUBBA RAO, 2008; SOUZA *et al.*, 2011).

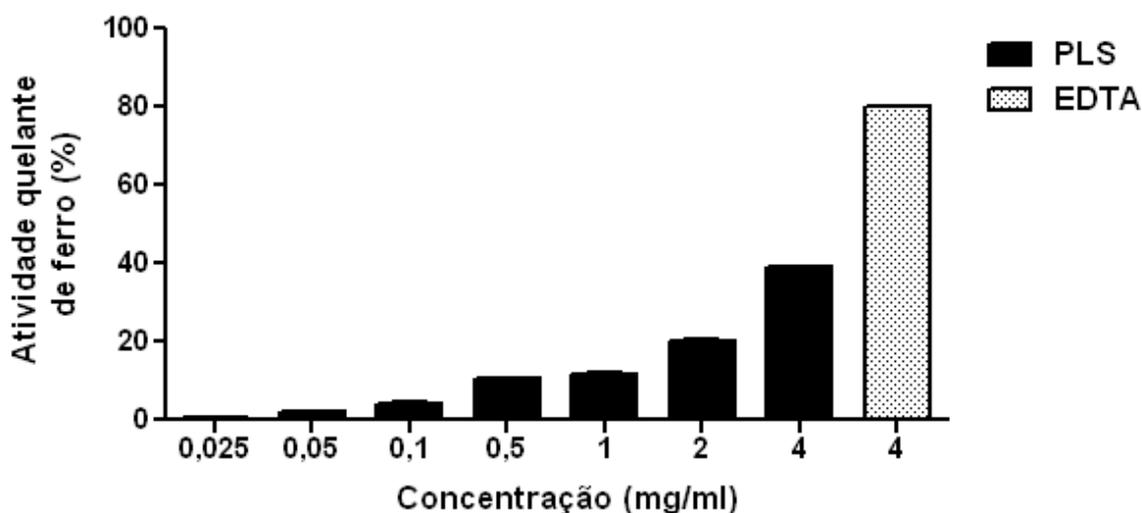
O sequestro do radical livre DPPH obtido para o PLS obteve resultados semelhantes ao encontrado por Souza *et al.* (2012), que encontraram uma  $IC_{50}$  de 1,62 mg/mL em um polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*. O sequestro do radical livre DPPH obtido para o PLS foi maior do que o encontrado por Dore *et al.* (2013), onde o polissacarídeo sulfatado da alga marrom *Sargassum vulgare*, na maior dose testada (3 mg/mL) foi encontrado apenas 22% de habilidade de sequestro do radical DPPH.

#### 5.4 Ensaio de quelação do íon ferroso

A figura 16 mostra a habilidade de quelação do íon ferroso do PLS extraído da alga *S. filiformis*. Essa atividade se comportou de maneira dose-dependente, porém em altas concentrações o mesmo manteve sua atividade quelante (4 mg/mL). No estudo realizado com uma fração polissacarídica extraída da alga *Laminaria japônica*, a habilidade de quelação dos íons de ferro foi independente da concentração das amostras, pois as amostras em baixas concentrações tiveram um caráter dose-dependente e à medida que aumentou a concentração ocorreu um declínio da quelação de ferro (WANG *et al.*, 2008).

Foi realizado a quelação do íon ferroso com o composto antioxidante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), quelante de íons metálicos, e observou-se uma IC<sub>50</sub> de 0,86 mg/mL. O PLS na maior concentração testada (4 mg/mL) obteve máxima quelação de ferro (39%), entretanto, esse valor foi muito menor quando comparado com o controle.

**Figura 16** - Habilidade de quelação do íon ferroso do PLS extraído da alga *Solieria filiformis*. Dados são expressos como média ± E.P.M (n=3).



Nos estudos realizados por Castro (2014) e Qi *et al.* (2005b), os autores sugerem que a atividade na quelação de íon ferroso em polissacarídeos oriundos de algas marinhas, está associado ao teor de sulfatação presente na estrutura química desses compostos de origem natural. Li & Shah (2014) também associaram a atividade antioxidante de polissacarídeos extraído do *Pleurotus eryngii* (conhecido

como cogumelo-do-cardo) e *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275, ao grau de sulfatação presente na estrutura química dos polissacarídeos.

A atividade quelante se resume à capacidade de um composto capturar íons metálicos presentes no meio, impossibilitando assim que o mesmo reaja com outras substâncias. Nos sistemas biológicos, alguns íons metálicos agem causando danos oxidativos, como nas lesões gástricas induzidas por etanol, através da catalisação de reações desfavoráveis ao organismo ou inativando enzimas (CHEW *et al.*, 2008).

Estudos sobre mecanismos de lesão oxidativa confirmam a ação catalítica dos metais pesados em processos patológicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). O ferro é o íon mais importante como pré-oxidante da peroxidação lipídica, que ocorre segundo a reação de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$ ), devido à sua alta reatividade (CHUN-HUI *et al.*, 2007). A peroxidação lipídica está associada a vários processos patológicos em sistemas biológicos (ZHANG *et al.*, 2011; CHUN-HUI *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2005b).

Dessa maneira, os resultados (Figura 16) sugerem que o PLS da alga *S. filiformis* agem como agente quelante de ferro e pode servir como um antioxidante secundário, devido à sua característica de reduzir o potencial redox, estabilizando assim a forma oxidada de íons de ferro.

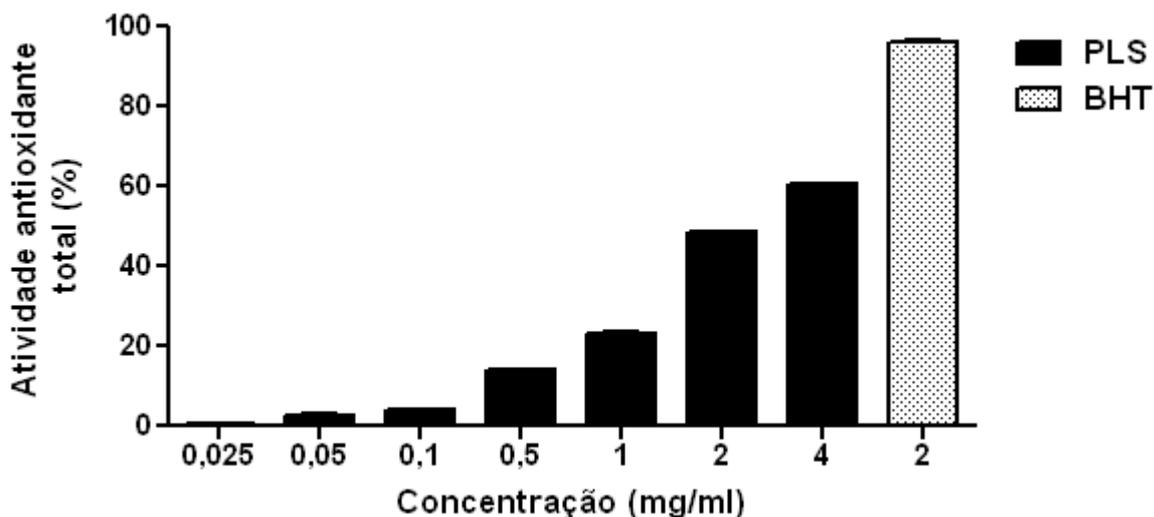
## **5.5 Ensaio da capacidade antioxidante total pela formação do complexo fosfomolibdênio**

A formação do complexo fosfomolibdênio é realizada pela redução do Molibdênio ( $\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+}$ ) pelo agente redutor (material de estudo) e complexação do molibdênio com fósforo em meio ácido (formando o fosfomolibdênio de cor azul) (PRIETRO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

A identificação de espécies antioxidantes específicos pode ser menos útil em alguns casos do que o conhecimento da capacidade antioxidante total. Outra situação em que o conhecimento da capacidade antioxidante total pode ser útil inclui a análise de mudanças na atividade antioxidante do plasma relacionados ao estresse oxidativo, ou a própria compreensão da relação da atividade estrutural das espécies antioxidantes puras (PIETRO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

O PLS da *S. filiformis* apresentou atividade na formação do complexo fosfomolibdênio (Figura 17) de forma dose-dependente, com uma IC<sub>50</sub> de 2,01 mg/mL. Castro *et al.* (2013) em estudo com polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Lobophora variegata* observou que 10 mg/mL de amostra teve atividade antioxidante total de 66,3%, concentração bem mais elevada do que a obtida nesse estudo, em que na concentração de 4 mg/mL foi observado 62,4% de atividade antioxidante. Por outro lado, os polissacarídeos da alga *L. variegata* apresentaram uma alta atividade na quelação de íons ferroso, com comportamento sem dose-dependência.

**Figura 17** -Capacidade antioxidante total do PLS extraído da alga *Solieria filiformis*.Dados são expressos como média ± E.P.M (n=3).



Em um estudo realizado por Castro (2014), que comparou a forma de extração e o teor de sulfatação da amostra com a atividade antioxidante total pelo método de fosfomolibdênio, foi associada a maior atividade antioxidante aos polissacarídeos com maiores quantidades de sulfato em sua composição química.

## 5.6 Efeito protetor do PLS em lesões gástricas induzidas por Etanol

Com o potencial antioxidante do PLS extraído da alga *S. filiformis* foi avaliado o efeito protetor do mesmo na mucosa gástrica, utilizando o modelo de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos.

Úlceras gástricas induzidas por etanol são um modelo experimental básico, utilizado para testar a atividade de compostos com atividade anti-úlceras, uma vez que o etanol penetra facilmente na mucosa gástrica lesionando a mesma (LI *et al.*, 2008). O tratamento com etanol provoca a indução do estresse oxidativo intracelular e conduz a transição da permeabilidade mitocondrial e despolarização, que leva à morte celular na mucosa gástrica (REPETTO; LLESUY, 2002).

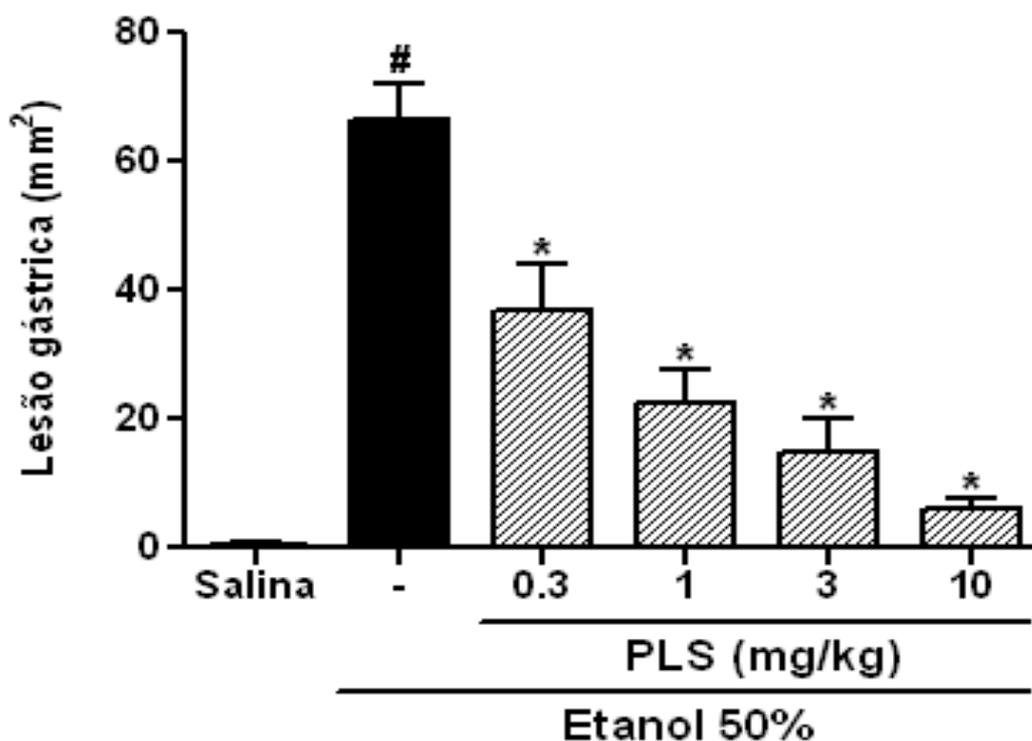
Essa patogênese da lesão gástrica induzida por etanol é um processo multifatorial, que depende do descontrole entre fatores agressivos e protetores, que ocorre de maneira direta ou indireta através de mediadores tais como os radicais livres e a lipoxigenase (ABDEL-SALAM *et al.*, 2001).

No presente estudo, podemos observar que os animais tratados com etanol 50% apresentaram, após 1 hora, extensas lesões macroscópicas na mucosa ( $66.58 \pm 5.6 \text{ mm}^2$ ) quando comparados ao grupo salina. A figura 18 mostra que o pré-tratamento com PLS, 30 minutos antes da administração do etanol 50%, diminuiu significativamente as lesões gástricas macroscópicas induzidas pelo etanol, em todas as doses testadas (0.3, 1, 3, 10 mg/Kg, *v.o.*).

É importante salientar que a resposta ao pré-tratamento com PLS ocorreu de maneira dose-dependente, em que a dose que obteve maior efeito na prevenção de lesões gástricas foi a de 10 mg/Kg ( $5.9 \pm 1.8 \text{ mm}^2$ ), reduzindo em aproximadamente 91%, o percentual de área ulcerada (Figura 18). Por esse motivo, essa dose foi selecionada para o estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na proteção gástrica mediada pelo PLS.

A gastrite aguda é ocasionada por diversos fatores, incluindo o uso de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais, etanol, isquemia, infecção por microrganismos, estresse agudo (choque), radiação e refluxo biliar (FAUCI *et al.*, 2008).

**Figura 18** - Efeito protetor do PLS da alga *Solieria filiformis* em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos. Os animais foram tratados, por gavagem, com o PLS (0,3, 1, 3, 10 mg/Kg) 30 min antes da administração de etanol 50% (0,5 mL/25g, v. o.). O grupo controle recebeu apenas salina ou salina + etanol 50%. As lesões macroscópicas gástricas foram determinadas após 1 h da administração do etanol. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 5- 6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  versus grupo salina, # $P < 0,05$  versus grupo etanol 50%. ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.



Atualmente, devido a esses diversos fatores que podem ocasionar lesão gástrica, a busca por compostos bioativos com atividade gastroprotetora de origem natural cresce a cada dia. Na literatura são encontrados vários trabalhos, com efeito gastroprotetor de polissacarídeos sulfatados derivados de algas marinhas, e nossos resultados são condizentes com estes (CHOI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; DAMASCENO *et al.*, 2013).

Dentre esses, o polissacarídeo da *Gracilaria birdiae* mostrou efeito gastroprotetor em lesões gastrointestinais induzidas por naproxeno e reduziu as lesões intestinais em modelo de colite em ratos (SILVA *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2014). Em adição, o polissacarídeo da *Hypnea muciformis* também mostrou atividade gastroprotetora em lesões induzidas por etanol, onde os autores sugeriram que o mecanismo de ação é secundário a atividade antioxidante e os resultados

encontrados para o PLS da alga *S. filiformis* são consistentes com estes (DAMASCENO *et al.*, 2013).

### 5.7 Efeito do PLS nos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica

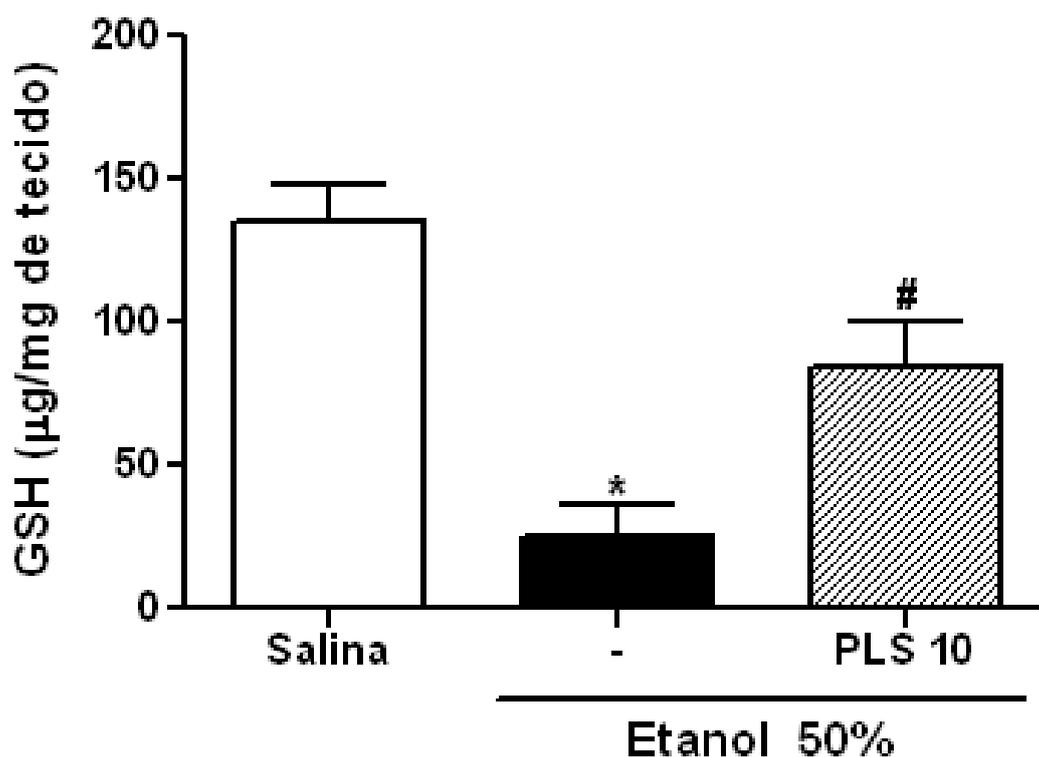
A glutathiona (GSH) é um dos mais prevalentes trióis de baixo peso molecular nas células de mamíferos (FRANCO *et al.*, 2007). É fundamental para a defesa antioxidante e regulação de vias essenciais para homeostase do corpo, através da catálise pela glutathiona S-transferase (GST) e glutathiona peroxidase (GPx) (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003; WU *et al.*, 2004).

A GSH encontra-se presente nas células e age como um bloqueador de radicais livres, bem como substrato para a glutathiona peroxidase, metabolizando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e outros hidroperóxidos no citosol e nas mitocôndrias (REED; FARISS, 1984). Observou-se nesse estudo que o etanol 50% depletou os níveis de GSH, provavelmente pela formação de radicais livres e subsequentemente o seu consumo, o que está de acordo com a literatura.

A dosagem de glutathiona (GSH) pode ser utilizada para determinar os níveis de grupos sulfidrílicos na mucosa gástrica, em que a administração de etanol reduziu significativamente o nível gástrico de GSH ( $25.1 \pm 11.1 \mu\text{g/g}$  de tecido), quando comparado com o grupo controle salina ( $135.2 \pm 12.8 \mu\text{g/g}$  de tecido). Na figura 19 podemos observar que a administração prévia do PLS da alga *S. filiformis* na dose de 10 mg/Kg obteve uma média de  $84,0 \mu\text{g/g}$  de tecido, esse resultado foi significativamente maior quando comparado com o grupo controle etanol 50%.

O PLS da alga *S. filiformis* apresentou-se efetivo em manter os níveis elevados de GSH no estômago. Esse resultado sugere, que a gastroproteção se deve, pelo menos em parte, às suas propriedades antioxidantes. O PLS possui em sua estrutura química um alto teor de sulfatação, que pode promover citoproteção pela inativação de radicais livres (QI *et al.*, 2005b). A figura 15 demonstra a capacidade do PLS no sequestro do radical DPPH. Dessa maneira, o efeito protetor pode ter ocorrido devido a um menor consumo de GSH consequente à inativação de radicais livres.

**Figura 19** -Efeito do PLS da alga *Solieria filiformis* nos níveis de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%. Os animais foram tratados por gavagem com o PLS (10 mg/Kg, v.o.) 30 min antes da administração de etanol 50% (0.5 mL/25g, v.o). O grupo controle foi tratado apenas com salina ou salina + etanol 50%. Os níveis de GSH foram determinados após 1 h à administração do etanol. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 5-6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  versus grupo salina, # $P < 0,05$  versus grupo etanol 50%. ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

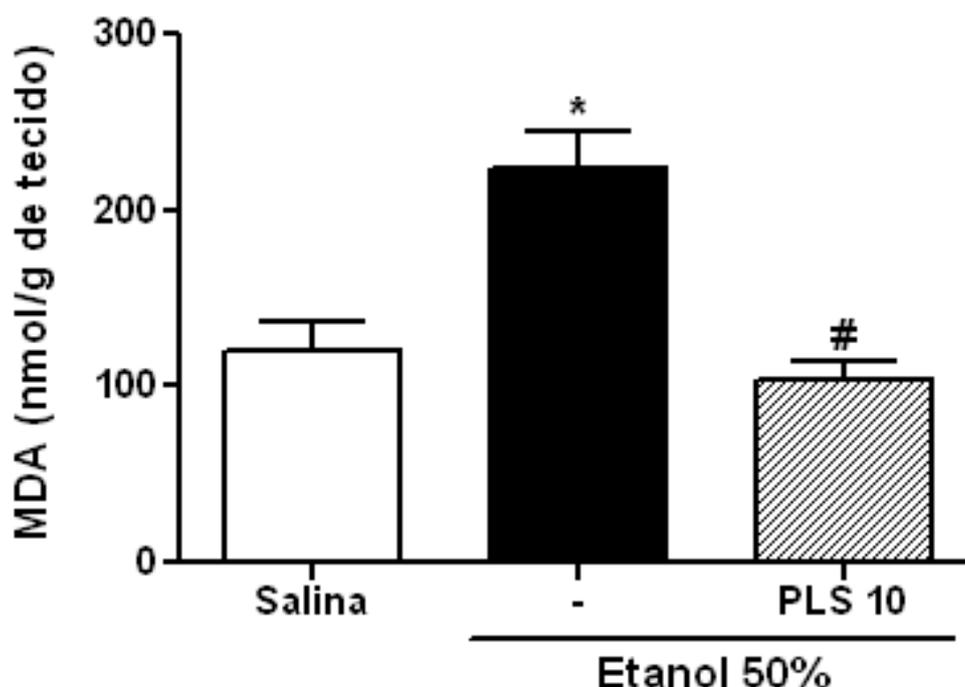


Damasceno *et al.* (2013) sugeriram que o polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Hypneia musciformis* apresentou efeito gastroprotetor por possuir efeito secundário, diminuindo a produção de radicais livres, consequentemente indicando possível atividade antioxidante dessa alga marinha. Silva *et al.* (2011) sugeriram que o efeito protetor do polissacarídeo sulfatado da alga *Gracilaria caudata* seria explicado pelo aumento dos níveis de GSH e/ou secundário ao decréscimo na produção de radicais livres.

### 5.8 Efeito do PLS nos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica

Na figura 20 podemos observar que os camundongos tratados com etanol 50% ( $224.2 \pm 21.1$  nmol/g de tecido) mostraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos níveis de malondialdeído (MDA) quando comparados com o grupo salina ( $119.7 \pm 17.7$  nmol/g de tecido), indicando que ocorreu peroxidação lipídica por EROs produzidas pelo etanol. Porém, quando realizado o pré-tratamento com o PLS (10 mg/Kg, v.o) ( $103.9 \pm 10.2$  nmol/g de tecido), preveniu o aumento dos níveis de MDA induzido pela administração de etanol 50%.

**Figura 20** - Efeito do PLS da alga *Solieria filiformis* nos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%. Os animais foram tratados por gavagem com o PLS (10 mg/Kg, v.o.) 30 min antes da administração de etanol 50% (0.5 mL/25g, v.o). O grupo controle foi tratado apenas com salina ou salina + etanol 50. Os níveis de MDA foram determinados após 1 h a administração do etanol. Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M de 5-6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  versus grupo salina, # $P < 0,05$  versus grupo etanol 50%. ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.



A peroxidação lipídica é resultado da reação de EROs contra a membrana celular, consequentemente gerando produtos que causam lesão gástrica oxidativa (KWIECIEN *et al.*, 2002). O MDA é um produto final da peroxidação lipídica, e esse tem sido considerado como principal indicador do processo lipoperoxidativo (LPO) (GAWEL *et al.*, 2003; DURSUN *et al.*, 2009). Por esse motivo, os níveis de MDA têm sido utilizados como um importante marcador da lesão oxidativa, sendo sua quantificação de suma importância para uma possível atividade antioxidante (KANTER *et al.*, 2005).

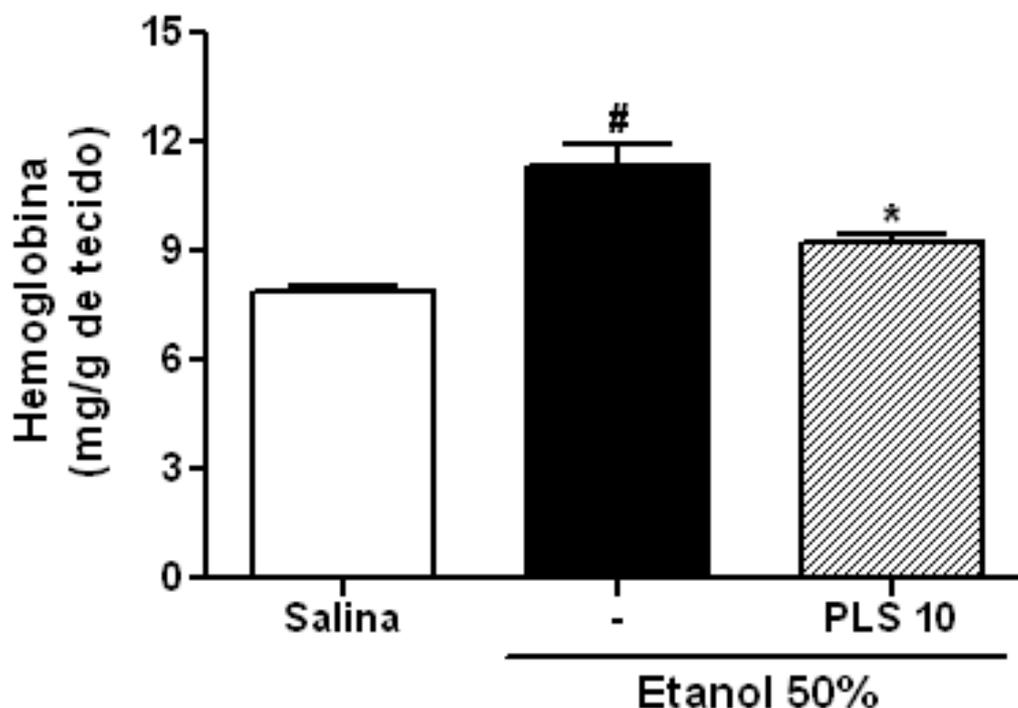
O PLS preveniu significativamente o aumento dos níveis de MDA, e essa propriedade antioxidante pode estar associada com atividade quelante de ferro que o mesmo demonstrou *in vitro* (figura 16). O ferro é um íon pré-oxidante da peroxidação lipídica, que ocorre segunda a reação de Fenton liberando radicais livres, extremamente danosos às células (CHUN-HUI *et al.*, 2007).

### **5.9 Efeito do PLS nas concentrações de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica**

Para avaliar o grau de hemorragia presente nos tecidos dos animais tratados com etanol 50%, foi utilizada a dosagem das concentrações de hemoglobina, através do teste colorimétrico para cianohematoglobina.

Podemos observar na figura 21, que os camundongos tratados com etanol 50% ( $11.31 \pm 0.59$  mg/g de tecido) mostraram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração de hemoglobina (Hb) quando comparados com o grupo salina ( $7.85 \pm 0.18$  mg/g de tecido), indicando que ocorreu hemorragia na mucosa gástrica pela administração de etanol 50%. Porém, quando realizado o pré-tratamento com o PLS ( $10 \text{ mg.Kg}^{-1} \text{ v.o}$ ) ( $9.25 \pm 0.17$  mg/g de tecido), preveniu significativamente o aumento na concentração de Hb.

**Figura 21** - Efeito do PLS da alga *Solieria filiformis* nas concentrações de hemoglobina (Hb) na mucosa gástrica de camundongos tratados com etanol 50%. Os animais foram tratados por gavagem com o PLS (10 mg.Kg<sup>-1</sup>, v.o.) 30 min antes da administração de etanol 50% (0.5 mL/25g, v.o.). O grupo controle foi tratado apenas com salina ou salina + etanol 50. As concentrações de Hb foram determinadas após 1 h a administração do etanol. Dados são expressos como média ± E.P.M de 5-6 animais por grupo. \* $P < 0,05$  versus grupo salina, # $P < 0,05$  versus grupo etanol 50%. ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.



O etanol é o principal fator que leva a danos intensos na mucosa gástrica e induz múltiplas faixas vermelhas hemorrágicas de tamanhos variados no eixo glandular do estômago (MINCIS *et al.*, 1995). Além disso, a estase no fluxo sanguíneo gástrico e interrupção microvascular levam a hemorragia e lesão do tecido necrosado (SZABO *et al.*, 1985).

Dosagens de hemoglobina em fragmentos de estômagos confirmaram a proteção gástrica, quando o PLS da alga *S. filiformis* foi utilizado previamente ao etanol. Dessa maneira, foi determinada bioquimicamente a diminuição de lesões hemorrágicas na mucosa gástrica dos animais tratados previamente com o PLS.

## 6. CONCLUSÕES

A alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson pode ser considerada uma fonte rica em polissacarídeos sulfatados, com atividade antioxidante e efetiva na proteção gástrica contra lesões induzidas por etanol.

A extração do PLS resultou em um rendimento de 21,3%, com uma estrutura química classificada como iota-carragenana (dissacarídeo de  $\beta$ -D-galactopiranosose-4-sulfato e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose-2-sulfato), apresentando peso molecular médio de 210,9 kDa com teor de sulfatação elevado (1,08).

O polissacarídeo apresentou propriedades antioxidantes, *in vitro*, no sequestro do radical DPPH (IC<sub>50</sub> de 1,77 mg.mL<sup>-1</sup>), quelação do íon ferroso (39%) e na capacidade antioxidante total (IC<sub>50</sub> de 2,01 mg.mL<sup>-1</sup>).

O pré-tratamento com o PLS da alga *S. filiformis* em lesões gástricas induzidas por etanol em camundongos, demonstrou um eficaz efeito protetor na mucosa gástrica de maneira dose dependente. É possível que seu mecanismo de ação esteja correlacionado com a diminuição de radicais livres, portanto aumentando os níveis de GSH e reduzindo a peroxidação lipídica, com consequente diminuição das concentrações de MDA. A diminuição nos níveis de Hb corrobora com a gastroproteção, enfatizando a diminuição de lesões hemorrágicas na mucosa gástrica.

Estas propriedades aliadas às favoráveis características produtivas da alga *Solieria filiformis*, fazem da mesma uma promissora fonte de iota-carragenana com propriedades farmacológicas, necessitando a realização de pesquisas específicas para aplicação do PLS na indústria farmacológica.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-SALAM, O. M.E. et al. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology-Paris**, v. 95, n. 1, p. 105-127, 2001.
- ADEYEMI, E. O. et al. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 27, p. 4154, 2005.
- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate polymers**, v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.
- ALLEN, A.; FLEMSTRÖM, G.. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 1, p. C1-C19, 2005.
- AMADOR, M. L. et al. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. **Annals of Oncology**, v. 14, n. 11, p. 1607-1615, 2003.
- ANDRADE, L. R. et al. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine pollution bulletin**, v. 60, n. 9, p. 1482-1488, 2010.
- ARAÚJO, I. W. F. et al. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1207-1215, 2011.
- ARMISEN, R. World-wide use and importance of Gracilaria. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 3, p. 231-243, 1995.
- ASSREUY, A. M. et al. Vascular effects of a sulfated polysaccharide from the red marine alga *Solieria filiformis*. **Natural product communications**, v. 5, n. 8, p. 1267-1272, 2010.
- BARROS, F. C. N. et al. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 598-603, 2013.
- BARROW, C; SHAHIDI, F. **Marine nutraceuticals and functional foods**. CRC Press, 2007.
- BARSANTI, L; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC press, 2014.
- BATISTA, J. A. et al. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 59-67, 2014.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. *Bioquímica*. Ed. 5. Guanabara Koogan, 2008.

BILICI, D. et al. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. **Digestive diseases and sciences**, v. 47, n. 4, p. 856-861, 2002.

BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, 181, 1199-1200, 1958.

BONDU, S. et al. In vitro cytotoxic and immunomodulative activities of low molecular weight *carrageenans* partially methylated and pyruvated. **Planta Medica**, v. 74, n. 09, p. 248, 2010.

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, p. 248-254, 1976.

BRITO, T. V. et al. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2014.

CAMPO, V. L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.

CASTRO, J. P. L. **Frações polissacarídicas obtidas a partir da alga vermelha gracilaria intermedia: um estudo químico estrutural, avaliação de atividade antioxidante e caracterização reológica**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2014.

CASTRO, L. S. E. P. W. et al. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown macroalgae *Lobophora variegata* with antioxidant, anti-inflammatory, and antitumoral effects. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-8, 2013.

CASTRO, L. S. E. P. W. et al. Potential anti-angiogenic, antiproliferative, antioxidant, and anticoagulant activity of anionic polysaccharides, fucans, extracted from brown algae *Lobophora variegata*. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-11, 2014.

CHEN, L. et al. The ratio of kappa-to lambda-carrageenan in nuclear phases of the rhodophycean algae, *Chondrus crispus* and *Gigartina stellata*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 53, n. 01, p. 11-16, 1973.

CHENG, H. et al. Extraction, antioxidant and antimicrobial activities of *Epimedium acuminatum* Franch. polysaccharide. **Carbohydrate polymers**, v. 96, n. 1, p. 101-108, 2013.

CHEUNG, L. Y. Gastric mucosal blood flow: its measurement and importance in mucosal defense mechanisms. **Journal of Surgical Research**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 1984.

CHEW, Y. L. et al. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1067-1072, 2008.

CHIOVITTI, A. et al. Pyruvated carrageenans from *Solieria robusta* and its adelphoparasite *Tikvahiella candida*. In: **Sixteenth International Seaweed Symposium**. Springer Netherlands, p. 401-409, 1999.

CHO, C. H. et al. Dual Effects of Zinc Sulphate on Ethanol-induced Gastric Injury in Rats: Possibly Mediated by an Action on Mucosal Blood Flow. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 41, n. 10, p. 685-689, 1989.

CHOI, E.Y. et al. Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 134-139, 2009.

CHUN-HUI, L. et al. 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, p. 961-970, 2007.

CNUBBEN, N. H.P et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 141-152, 2001.

COSENZA, V. A. et al. Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 780-789, 2014.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 21-28, 2010.

COSTA, L. S. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. **Marine drugs**, v. 9, n. 6, p. 952-966, 2011.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. Guanabara Koogan, 2000.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DAMASCENO, S. R.B et al. Role of the NO/K ATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 320-328, 2013.

DANTAS-SANTOS, N. et al. Freshwater plants synthesize sulfated polysaccharides: Heterogalactans from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 1, p. 961-976, 2012.

- DAVENPORT, H. W. Ethanol damage to canine oxyntic glandular mucosa. **Experimental Biology and Medicine**, v. 126, n. 3, p. 657-662, 1967.
- DAVENPORT, H. W. Gastric mucosal hemorrhage in dogs. **Gastroenterology**, v. 56, n. 3, p. 439-449, 1969.
- DE ALMEIDA, C. L. F. et al. Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 7, p. 4550-4573, 2011.
- DE MORAIS, S. M. et al. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Braz J Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.
- DE OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Redes**, 2011.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106, 1962.
- DORE, C. M. P. G. et al. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 1, p. 467-475, 2013.
- DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- DURSUN, H. et al. Antiulcer activity of fluvoxamine in rats and its effect on oxidant and antioxidant parameters in stomach tissue. **BMC gastroenterology**, v. 9, n. 1, p. 36, 2009.
- EL GAMAL, A., A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-25, 2010.
- ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M; CEREZO, A. S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate research**, v. 339, n. 15, p. 2575-2592, 2004.
- FARIAS, W. R. L et al. 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, p. 29299-29307, 2000.
- FAUCI, A.S. et al. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. McGraw-Hill Editora, 17ª edição, parte 13, Capítulos 284 e 287, 2008.
- FERNANDES, W. R. et al. Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutatona reduzida (GSH) eritrocitária. **Pesq. Vet. Bras**, v. 32, n. 7, p. 677-680, 2012.

FLORES, M.L et al. Studies on the skeletal cell wall and cuticle of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* Bory. **Botanica marina**, v. 40, n. 1-6, p. 411-420, 1997.

FONSECA, R. J.C. et al. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart**, v. 99, n. 3, p. 539, 2008.

FRANCO, R. et al. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 113, n. 4-5, p. 234-258, 2007.

GAWEŁ, S. et al. [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. **Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)**, v. 57, n. 9-10, p. 453-455, 2003.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 3, n. 1, p. 29-40, 2014.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1514-1520, 2011.

GONZALEZ, F. G. et al. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2001.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9, p. 922-935, 1999.

GUSLANDI, M. Effects of ethanol on the gastric mucosa. **Digestive Diseases**, v. 5, n. 1, p. 21-32, 1987.

GUTH, P. H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 65, n. 6, p. 677, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 1-85, 1989.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928-2935, 2005.

HU, G.P. et al. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine drugs**, v. 9, n. 4, p. 514-525, 2011.

HUANG, R. et al. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. **Scientia Horticulturae**, v. 113, n. 2, p. 166-172, 2007.

HUI, W. M. et al. Role of gastric mucosal blood flow in cytoprotection. **Digestion**, v. 48, n. 2, p. 113-120, 1991.

HWANG, P.A.; HUNG, Y.L.; CHIEN, S.Y. Inhibitory activity of *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide in arachidonic acid-induced animal models of inflammation. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2014.

ICHIKAWA, T. et al. The mucin biosynthesis stimulated by epidermal growth factor occurs in surface mucus cells, but not in gland mucus cells, of rat stomach. **Life Science**, v. 67, p. 1095-1101, 2000.

ISHIHARA, K. et al. Mucus glycoprotein and mucosal protection. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 10, p. S24-27S, 1988.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v.9, p.196-223, 2011.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. Infrared characterisation, monosaccharide profile and antioxidant activity of chemical fractionated polysaccharides from the edible seaweed sugar Kombu (*Saccharina latissima*). **International Journal of Food Science & Technology**, 2014.

KALITNIK, A. A. et al. Gelling polysaccharide from *Chondrus armatus* and its oligosaccharides: the structural peculiarities and anti-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, 2014.

KANTER, M. et al. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 42, p. 6662, 2005.

KLOAREG, B. et al. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology: an annual review.**, v. 26, p. 259-315, 1988.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanography Marine Biological Annual Review**, v.26, p.259-315, 1988.

KNUTSEN, S. H. et al. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica marina**, v. 37, n. 2, p. 163-170, 1994

KO, J. K.S.; CHO, C. H.; LAM, S.K. Adaptive cytoprotection through modulation of nitric oxide in ethanol-evoked gastritis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 17, p. 2503-2508, 2004.

KRAVCHENKO, A. O. et al. Structural peculiarities of polysaccharide from sterile form of Far Eastern red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. **Carbohydrate polymers**, v. 111, p. 1-9, 2014.

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.

KWIECIEN, S. et al. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 39-50, 2002.

KWIECIEN, S. et al. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide-donors on stress-induced gastric mucosal lesions. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, p. 761-773, 2002.

LA CASA, C. et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 45-53, 2000.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of applied Phycology**, v. 13, n. 2, p. 173-184, 2001.

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

LAINÉ, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.

LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p. 468-473, 2003.

LECHAT, H. et al. Structure and distribution of glucomannan and sulfated glucan in the cell walls of the red alga *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 36, n. 5, p. 891-902, 2000.

LI, C. Y. et al. Gastroprotective effect of cyanidin 3-glucoside on ethanol induced gastric lesions in rats. **Alcohol**, v. 42, n. 8, p. 683-687, 2008.

LI, S.; SHAH, N. P. Antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Food Chemistry**, 2014.

LIMA, T.B. **Cultivo da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kutzing) P.W. Gabrielso: Textura de géis aquosos e lácteos**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2012.

LIU, X. et al. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 4, p. 1664-1670, 2012.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food chemistry**, v. 68, n. 1, p. 81-85, 2000.

MACMATH, T. L. Alcohol and gastrointestinal bleeding. **Emergency medicine clinics of North America**, v. 8, n. 4, p. 859-872, 1990.

MAITY, S. et al. Role of reduced glutathione and nitric oxide in the black tea extract-mediated protection against ulcerogen-induced changes in motility and gastric emptying in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 85, p. 358-364, 2001.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 329-333, 2003.

MATSUI, H. et al. The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 48, n. 2, p. 107, 2011.

MCCANDLESS, E. L.; WEST, J. A.; GUIRY, M. D. Carrageenan patterns in the Gigartinaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, n. 3, p. 175-182, 1983.

MCHUGH, D., J. **A guide to the seaweed industry**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003.

MEDEIROS, J. V. R. et al. Role of the NO/cGMP/KATP pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 4, p. 721-727, 2008.

MEDEIROS, J. V. R. et al. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 330, n. 3, p. 764-770, 2009.

MELO, F. R. et al. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides different mechanisms for heparin and sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20824-20835, 2004.

MELO, M. R. S. et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 4, p. 491-498, 2002.

MENDES, G. S. et al. Structure and anti-metapneumovirus activity of sulfated galactans from the red seaweed *Cryptonemia seminervis*. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 313-323, 2014.

MICHEL, G. et al. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. **New Phytologist**, v. 188, n. 1, p. 82-97, 2010.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, 271-278, 1978.

- MILLER, T.A. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 245, n. 5, p. G601-G623, 1983.
- MILLER, T. A. et al. Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: effects of PGE2 and ethanol. **Am J Physiol**, v. 249, n. 1 Pt 1, p. G137-G144, 1985.
- MINCIS, M. et al. Etanol e o trato gastro-intestinal. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 32, p. 131-139, 1995.
- MIZUI, T. et al. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. **Life sciences**, v. 41, n. 6, p. 755-763, 1987.
- MOHAMED, S.; HASHIM, S.N.; RAHMAN, H. A. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 2, p. 83-96, 2012.
- 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, n. 1, p. 59-66, 1998.
- MURANO, E. et al. Chemical and macromolecular characterisation of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate polymers**, v. 18, n. 3, p. 171-178, 1992.
- MURANO, E. et al. Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiella subulata* from Mar Piccolo, Taranto. **Marine chemistry**, v. 58, n. 3, p. 319-325, 1997.
- NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger: Principios de bioquímica**. 5 ed. São Paulo: Artmed, 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- OLIVEIRA, F. A. et al. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 2, p. 105-111, 2004.
- OLIVEIRA, L. S. et al. The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata*) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 151-160, 2011.
- ORDONEZ, E. G.; ESCRIG, A. J.; RUPEREZ, P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from northwestern Spanish coast. **Food Research International**, v. 43, p. 2289-2294, 2010.
- OTHMER, K; **Encyclopedia of Chemical Technology**, vol. 4. 1992.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. *In: The polysaccharides*. New York: Academic Press, 1983.

PAN, J.S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 38, p. 5857, 2008.

PAREKH, R. G. et al. PHYCOCOLLOID FROM MARINE RED ALGA, HYPNEA-MUSCIFORMIS (WULF) LAMOUR. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 17, n. 3, p. 242-243, 1988.

PAREKH, R. G.; RAO, K.R.; CHAUHAN, R. Polysaccharide from *Sarconema filiforme*, an indian marine alga. **Phytochemistry**, v. 27, n. 3, p. 933-934, 1988.

PAREKH, R. G. et al. Studies on extraction of k carrageenan from *Hypnea*. In: **Proceedings and International Symposium on Marine Algae and Industry. Ocean Reg. CSMCRI, Bhavnagar**. p. 7-10, 1979.

PARK, J. S. et al. Capsaicin protects against ethanol-induced oxidative injury in the gastric mucosa of rats. **Life sciences**, v. 67, n. 25, p. 3087-3093, 2000.

PARK, J. G. Invited Mini Review: The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. **Biochemistry and Molecular Biology Reports**, v. 44, n. 8, p. 497-505, 2011.

PERCIVAL, E.I; MCDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. 1967.

PEREIRA, J. G. et al. Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. **Carbohydrate polymers**, v. 108, p. 17-25, 2014.

PEREIRA, L. et al. VIBRATIONAL SPECTROSCOPY (FTIR-ATR AND FT RAMAN) - A Rapid and Useful Tool for Phycocolloid Analysis. 2011.

PEREIRA, L.; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed with Potential Use in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries. **Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology**, p. 228, 2014.

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

PÉREZ-RECALDE, M. et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed *Nemalion helminthoides*. **International journal of biological macromolecules**, v. 63, p. 38-42, 2014.

- PIRES, C. L. et al. Evaluation of macroalgae sulfated polysaccharides on the *Leishmania (L.) amazonensis* promastigote. **Marine drugs**, v. 11, n. 3, p. 934-943, 2013.
- POMIN, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review. **Glycoconjugate journal**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2010.
- PONTES, G. C. et al. Carragenanas da rodofícea *Solieria filiformis* (KÜTZING) PW Gabrielson: análise por duas metodologias de precipitação. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 1, p. 67-79, 2009.
- PRADO-FERNÁNDEZ, J. et al. Quantitation of  $\kappa$ -,  $\iota$ - and  $\lambda$ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, n. 1, p. 23-37, 2003.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K.. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.
- QI, H. et al. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 6, p. 527-534, 2005a.
- QI, H. et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 195-199, 2005b.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7. ed. , Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- REED, D. J.; FARISS, M. W. Glutathione depletion and susceptibility. **Pharmacological reviews**, v. 36, n. 2, p. 25S-33S, 1984.
- REPETTO, M.G, LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Braz J Med Biol Res.**;v. 35, p.523–34, 2002.
- RIBEIRO, N. A. et al. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflammation Research**, p. 1-12, 2014.
- ROBERT, André. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 77, n. 4, p. 761-767, 1979.

ROBLEDO, D.; FREILE PELEGRIN, Y. Chemical and mineral composition of six potentially edible seaweed species of Yucatan. **Botanica Marina**, v. 40, n. 1-6, p. 301-306, 1997.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 29, n. 4, p. 335-340, 1986.

RODRIGUES, J. A. G. et al. Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil-[doi: 10.4025/actascitechnol.v33i2.9096](https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v33i2.9096). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2011.

RODRÍGUEZ, M. C. et al. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina—Content, structure and physical properties. **Bioresource technology**, v. 100, n. 3, p. 1435-1441, 2009.

ROMERO, J. B.; VILLANUEVA, R. D.; MONTAÑO, M. N. E. Stability of agar in the seaweed *Gracilaria eucheumatoides* (Gracilariales, Rhodophyta) during postharvest storage. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8151-8155, 2008.

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia Científica**: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical DPPH. [Comunicado Técnico], ISSN 1679-6535, Julho, Fortaleza, Ceará, 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.76, p.270-276. 1998.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. 1, 8-cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Digestive diseases and sciences**, v. 46, n. 2, p. 331-337, 2001.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-13, 2004.

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

SEIFRIZ, I. **Propriedades antioxidantes de produtos de origem natural com potencial medicinal**: proteção da ação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio sobre membranas lipídicas e ação como sequestradoras de radicais livres. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis: Editora UFSC; 2008.

SHAO, P.; CHEN, X.; SUN, P..Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*. **Carbohydrate polymers**, v. 105, p. 260-269, 2014.

- SIEGMUND, S.; TEYSSEN, S.; SINGER, M. V. Alcohol-associated organ damage. Health sequelae caused by moderate alcohol drinking. **Itarnist** (Berl), v. 43, p. 287 – 293, 2002.
- 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
- SILVA, F. R. F. et al. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26-33, 2010.
- SILVA, R. O. et al. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine drugs**, v. 10, n. 12, p. 2618-2633, 2012.
- SILVA, R. O. et al. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. **Marine drugs**, v. 9, n. 11, p. 2188-2200, 2011.
- SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica 1**. LTC, 2006.
- SOUZA, B.W.S et al. 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 et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 287-292, 2012.
- STEGHENS, J.P. et al. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.
- STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 483-501, 2011.
- STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their Application**. Department of Chemistry, University of Cape Town, Rondebosch, South Africa. Marcel Dekker Inc. New York, USA, 1995.
- STEPHANIE, B. et al. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 448-460, 2010.
- STORTZ, C.A.; CERREZO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Current topics in Phytochemistry**, v.4, p.121-134, 2000.

STRUŻYŃSKA, L.; CHALIMONIUK, M.; SULKOWSKI, G. The role of astroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. **Toxicology**, v. 212, n. 2, p. 185-194, 2005.

SZABO, S. et al. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology*, v. 88, p. 228–236, 1985.

SZABO, S.; NAGY, L.; PLEBANI, M. Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. **Clinica chimica acta**, v. 206, n. 1, p. 95-105, 1992.

TAKAHASHI, M.; SHIBATA, M.; NIKI, E. Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 164-174, 2001.

TALARICO, L. B. et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral research**, v. 66, n. 2, p. 103-110, 2005.

TARNAWSKI, A. S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Digestive diseases and sciences**, v. 50, n. 1, p. S24-S33, 2005.

TASHIRO, Y. et al. Molecular Weight Determination of Agar by Sedimentation Equilibrium Measurements. **Fisheries science**, v. 62, n. 1, p. 80-83, 1996.

THUY, T. T. T. et al. Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species. **Carbohydrate polymers**, v. 115, p. 122-128, 2015.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 3, p. 145-155, 2003.

USOV, A.I.; BILAN, M.I. Review – Fucoidans – sulfated polysaccharides of brown algae. **Russian Chemical**, v.78, n.8, p.785-799, 2009.

VAN DE VELDE, F. et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 3, p. 73-92, 2002.

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

VILLANUEVA, R. D.; MONTAÑO, M. N. E. Fine chemical structure of carrageenan from the commercially cultivated *Kappaphycus striatum* (sacol variety)(solieriaceae, gigartinales, rhodophyta) 1. **Journal of phycology**, v. 39, n. 3, p. 513-518, 2003.

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.

WANG, J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127-132, 2008.

WANG, J. et al. 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.

WANG, J. et al. Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 44, n. 2, p. 170-174, 2009.

WIJESEKARA, I.; KIM, S.K. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. **Marine drugs**, v. 8, n. 4, p. 1080-1093, 2010.

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

WIJESEKARA, I.; YOON, N. Y.; KIM, S.K. Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. **Biofactors**, v. 36, n. 6, p. 408-414, 2010.

WOMERSLEY, H.B.S. **The marine benthic flora of southern Australia. Rhodophyta: Part IIIA.** Bangiophyceae and Florideophyceae (Acrochaetiales, Nemaliales, Gelidiales, Hildenbrandiales and Gigartinales *sensu lato*). Canberra: Australian Biological Resources Study, 1994. 508p.

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.

WU, M. et al. Evaluation of antioxidant activities of water-soluble polysaccharides from brown alga *Hizikia fusiformis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 56, p. 28-33, 2013.

YANG, X. et al. Compositional characterisation of soluble apple polysaccharides, and their antioxidant and hepatoprotective effects on acute CCl<sub>4</sub>-caused liver damage in mice. **Food chemistry**, v. 138, n. 2, p. 1256-1264, 2013.

YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral research**, v. 86, n. 3, p. 231-240, 2010.

ZHANG, H.J. et al. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate polymers**, v. 71, n. 3, p. 428-434, 2008a.

ZHANG, Z. et al. Extraction optimisation and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from *Allium macrostemon* Bunge. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 4, p. 723-730, 2012.

ZHANG, Z. et al. Potential antioxidant activities in vitro of polysaccharides extracted from ginger (*Zingiber officinale*). **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 448-452, 2011.