



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

MAYARA FREIRE DE ALENCAR ALVES

ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA E ANTIOXIDANTE DE LECTINA DE
***Bryothamnion triquetrum* EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR**
ESTREPTOZOTOCINA

FORTALEZA

2015

MAYARA FREIRE DE ALENCAR ALVES

ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA E ANTIOXIDANTE DE LECTINA DE *Bryothamnion triquetrum* EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda
Teixeira

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- A48 Alves, Mayara Freire de Alencar.
 Atividade antihiperlipidêmica e antioxidante de lectina de *Bryothamnion triquetrum* em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina / Mayara Freire de Alencar Alves. – 2015. 53 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2015.
 Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.
1. Diabetes. 2. Lectina de algas. 3. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 660.6

MAYARA FREIRE DE ALENCAR ALVES

ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA E ANTIOXIDANTE DE LECTINA DE *Bryothamnion triquetrum* EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Data da aprovação: 13 / 02 / 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

~~Prof. Dr. Jorge Luis Martins~~
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

A Deus, minha proteção, minha força,
meu amparo.

À minha família que se dedica, participa e
investe na minha educação.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À diversidade da vida por todas as possibilidades de investigação: a busca por respostas e a formulação de novas perguntas.

Aos meus pais, Gesser e Elioene por todo carinho e apoio durante os meus anos de educação e por me incentivarem a seguir a carreira acadêmica.

Aos meus irmãos não de sangue, mas, de coração: Milena Abrão, Bruno Jaegger, Nayara Oliveira, Dayana Alves e André Guimarães, juntos desde o início da graduação até o resto da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, pela confiança conferida a mim nesse período. Aos seus conselhos profissionais, as discussões, as risadas compartilhadas entre nós foram todos passos para construir o meu caminho acadêmico.

Aos Prof. Dr. Alexandre e Prof. Dr. Jorge por terem aceitado participar da banca contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório Integrado de Biomoléculas principalmente aos cuidados especiais do doutorando Luiz pelas eternas discussões para início do projeto e desenvolvimento deste. Bruno Rocha pelos conselhos a uma recém integrante do meio científico e sua parceria nas confraternizações. Chica Kalline pelo apoio psicológico e técnico em todas as etapas do experimento e pelo agradável convívio que ainda irá perdurar por muito tempo, espero. Camila Aparecida, Camila Nottingham, Juliana e Gleiciane, estudantes de iniciação científica, que foram de suma importância para realização de todo o experimento.

Aos Pós-doutorandos Mayron e Vavá pela disposição conferida sempre que necessária e que foi de grande valia para a construção do conhecimento científico.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais.

À CAPES e à FUNCAP pelo auxílio financeiro

Agradeço.

“Deem graças ao Senhor porque ele é bom; o seu amor dura para sempre.”

(Salmo 118,1)

RESUMO

Diabetes *mellitus* é uma síndrome metabólica de origem múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade de a insulina exercer adequadamente seus efeitos, causando um aumento da glicose no sangue. O diabetes acontece porque o pâncreas não é capaz de produzir o hormônio insulina em quantidade suficiente para suprir as necessidades do organismo, ou porque este hormônio não é capaz de agir de maneira adequada (resistência à insulina). Evidências sugerem que as lesões causadas pelo estresse oxidativo causado pelos radicais livres contribuem para as complicações do diabetes diminuindo as defesas antioxidantes enzimáticas e estas estão correlacionadas com a gravidade das alterações patológicas. Os produtos naturais têm sido a maior fonte de inspiração para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas e, entre elas, a produção de fármacos. Lectinas de algas marinhas são descritas como possuidoras de atividade anti-inflamatória, antimutagênica, antitumoral, e propriedades antihipertensivas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antihiperlipidêmica e antioxidante da lectina de *Bryothamnion triquetrum* (BTL) *in vivo*. Para esta avaliação ratos Wistar foram induzidos a hiperglicemia utilizando estreptozotocina e a eficácia e eficiência do tratamento foi avaliado a partir de coletas de soro para mensuração de glicose, colesterol total, triglicérides, glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase nos períodos 7, 14 e 21 dias após confirmação da hiperglicemia, sendo feita a excisão de pâncreas e fígado no dia 21 para análise histopatológica. Os resultados demonstraram que BTL apresentou eficiência e eficácia quando comparada a droga padrão-ouro, a glibenclamida, promovendo diminuição dos níveis séricos de glicose, colesterol total, triglicérides e aumentando os níveis de enzimas antioxidantes. Em conclusão, estes achados propõem que a BTL promove uma potente proteção aos danos causados pela diabetes induzida.

Palavras-chave: Diabetes. Lectina de algas. Estresse oxidativo

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic syndrome multiple origin, due to the lack of insulin and / or insulin inability properly exert its effects, causing an increase in blood glucose. Diabetes is because the pancreas is not able to produce the hormone insulin in sufficient quantities to meet the needs of the body, or because this hormone are not able to act appropriately (insulin resistance). Evidence suggests that caudadas injury by oxidative stress caused by free radicals contribute to the complications of diabetes by decreasing the enzymatic antioxidant defenses, and these are correlated with the severity of the pathological changes. Natural products have been the major source of inspiration for many areas of chemistry and science in general. Using, copying or modifying the molecules synthesized by living things, man has obtained innovations to your benefit in several areas, and among them, the production of drugs. Lectins seaweed are described as having anti-inflammatory activity, antimutagenic, anti-tumor, and anti-hypertensive properties. This study aimed to evaluate the antihyperglycemic and antioxidant activity of lectin *Bryothamnion triquetrum* (BTL) *in vivo*. For this evaluation Wistar rats were induced hyperglycemia using streptozotocine and the effectiveness and efficiency of treatment was evaluated from serum samples for measurement of glucose, total cholesterol, triglycerides, glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase in the periods 7, 14 and 21 days after confirmation of hyperglycemia, being made excision of pancreas and liver on day 21 for histopathological analysis. The results presented show that BTL efficiency and effectiveness when compared to gold standard drug; glibenclamide promoting reduction in serum levels of glucose, total cholesterol, triglycerides and increasing the levels of antioxidant enzymes. In conclusion, these findings suggest that the BTL promotes a powerful protection to damage induced diabetes.

Keywords: Diabetes. Lectin algae. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo	no	diabetes mellitus	12
Figura 2 – Mecanismo de desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares	do	diabetes mellitus	16
Figura 3 – Reação da catalase			17
Figura 4 – Fármacos utilizados no tratamento da DM tipo 2			19
Figura 5 – Anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC		hiperglicemia induzida	20
Figura 6 – Classificação estrutural de lectinas			22
Figura 7 – Níveis de glicemia em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática			32
Figura 8 – Níveis de colesterol total em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática			34
Figura 9 – Níveis de triglicérides em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática			36
Figura 10 – Níveis de superóxido dismutase (SOD) em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática			37
Figura 11 – Níveis de catalase (CAT) em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática			39
Figura 12 – Níveis de glutathiona peroxidase (GPx) em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática			39
Figura 13 – Fotomicrografia de fígado			41
Figura 14 – Fotomicrografia de pâncreas			42

SUMÁRIO

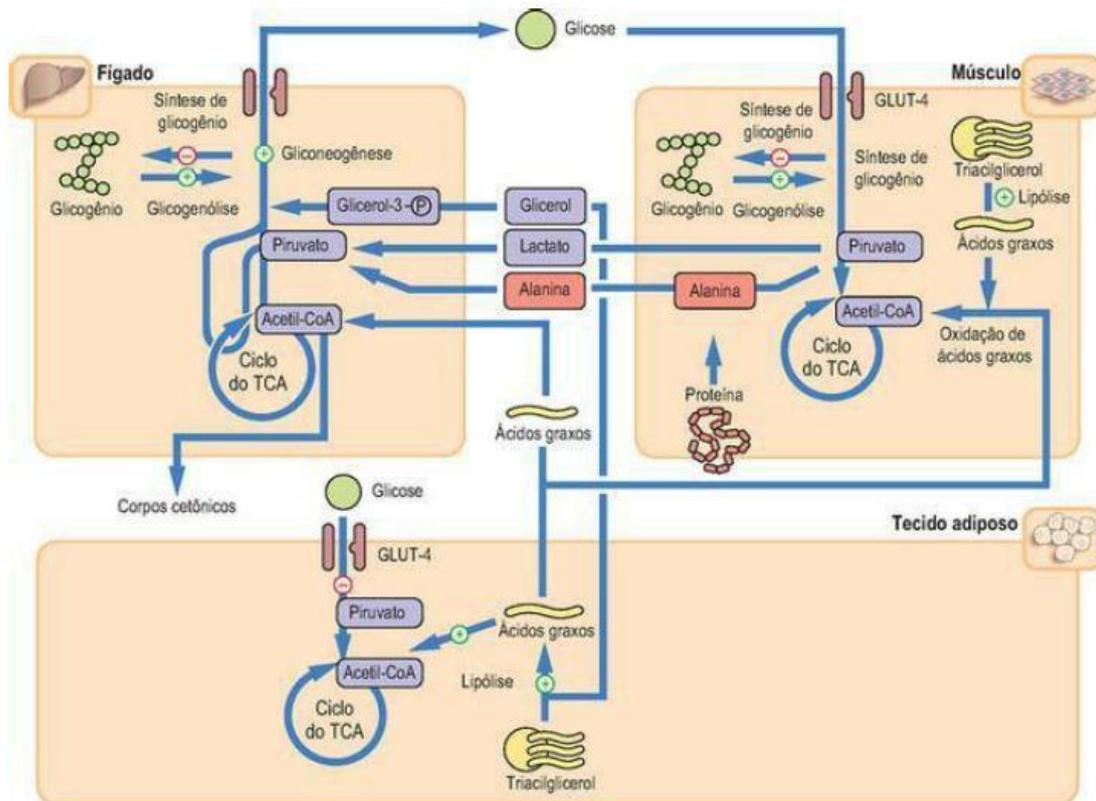
1	INTRODUÇÃO	11
1.1	DIABETES MELLITUS	11
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO.....	14
1.3	TRATAMENTO DO DIABETES 1 E 2.....	18
1.4	DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA..	19
2	LECTINAS	21
2.1	BREVE HISTÓRICO	21
2.2	DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	21
2.3	LECTINAS DE ALGAS MARINHAS	23
2.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE LECTINAS.....	25
2.5	OBJETIVOS	27
2.5.1	GERAL.....	27
2.5.2	ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	MATERIAIS	28
3.1.1	<i>Lectina</i>	28
3.1.2	<i>Animais experimentais</i>	28
3.2	MÉTODOS.....	28
3.2.1	<i>Indução do Diabetes</i>	28
3.2.2	<i>Tratamento</i>	29
3.2.3	<i>Testes bioquímicos</i>	29
3.2.3.1	<i>Glutaciona peroxidase (GPx)</i>	30
3.2.3.2	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	30
3.2.3.3	<i>Catalase (CAT)</i>	30
3.2.4	<i>Avaliação histopatológica</i>	30
3.2.5	<i>Análise estatística</i>	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5	CONCLUSÃO	42
6	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes Mellitus (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014). A classificação atual do DM proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) baseia-se na etiologia, e não no tipo de tratamento, portanto os termos DM insulino dependente e DM insulino independente devem ser eliminados dessa categoria classificatória. (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, c2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, c1999).

Sendo o diabetes *mellitus* uma doença metabólica crônica caracterizada por distúrbio no metabolismo da glicose, relaciona-se fisiologicamente à deficiência de insulina, resultando no aumento da concentração de glicose no sangue, denominada hiperglicemia, condição principal definida pela OMS para determinação da doença (FIGURA 1). Esta doença está acompanhada frequentemente por complicações micro e macrovasculares, que afetam principalmente o sistema cardiovascular e o sistema nervoso, causando problemas como: doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, retinopatia, nefropatia e neuropatia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, c2006; SOUZA *et al.*, 2012).

Figura 1 – Metabolismo no diabetes *mellitus*

Fonte: Baynes (2007).

Há uma habilidade diminuída dos tecidos para utilizarem glicose devido à falta de insulina ou a uma ação defeituosa da insulina. A hiperglicemia é causada pelo efeito combinado da captação periférica da glicose diminuída e da gliconeogênese hepática aumentada. Na figura 1 note o excesso de ácidos graxos disponíveis para o fígado, junto com o ciclo do TCA menos eficiente (BAYNES, 2007).

A deficiência de insulina, fator determinante para ocorrência da fisiopatologia, pode ocorrer devido a sua secreção inadequada, devido a uma produção insuficiente deste hormônio ou da falência das células beta em reconhecer os estímulos para secreção de insulina. Ou ainda, pode ser decorrente da ação minimizada da insulina, em virtude da redução de seus receptores na superfície das células-alvo (PEREIRA, 2008; ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2004). A hiperglicemia tem sido identificada na patogênese da lesão endotelial no diabetes e, em particular, no diabetes tipo 1 (DM1), que está presente em 5% a 10% da população apresentando disfunção endotelial mesmo quando a normoglicemia é alcançada sendo sugerido que o estresse oxidativo tenha papel central na patogênese das complicações do

diabetes (THOMÁS, 2002; HUVERS, 1999; DOGRA, 2001; BROWNLEE, 2001). Na maioria dos casos de DM1, a destruição de células beta é mediada por autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referidos como forma idiopática de DM1. Os marcadores de autoimunidade são os auto-anticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico, antitirosina-fosfatases e antitransportador de zinco (PALMER, 1983; BAEKKESKOV, 1990). Esses anticorpos podem estar presentes meses ou anos antes do diagnóstico clínico, ou seja, na fase pré-clínica da doença, e em até 90% dos indivíduos quando se detecta hiperglicemia. Além do componente autoimune, o DM1 apresenta intensa associação a determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), alelos que podem suscitar o desenvolvimento da doença ou proteger contra ela (TODD, 1987; ERLICH, 2008).

O DM2 é a forma presente em 90% a 95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina. Em geral, ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e cetoacidose raramente se desenvolve de modo espontâneo, ocorrendo apenas quando se associa a outras condições como infecções. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014). Determinados grupos raciais e culturais apresentam um maior risco: os da raça negra e os hispânicos apresentam um risco duas a três vezes maiores de apresentar o diabetes tipo 2. Eles também tendem a ocorrer em família. Outras causas menos comuns de diabetes são a concentração anormalmente alta de corticosteróides, a gravidez (diabetes gestacional), medicamentos e venenos que interferem na produção ou nos efeitos da insulina, acarretando uma concentração sérica alta de glicose (PASSOS *et al.*, 2005).

O DM vem aumentando sua importância pela sua crescente prevalência e habitualmente está associado à dislipidemia, à hipertensão arterial e à disfunção endotelial sendo um problema de saúde considerado Condição Sensível à Atenção Primária, ou seja, evidências demonstram que o bom manejo deste problema ainda na Atenção Básica evita hospitalizações e mortes por complicações cardiovasculares e cerebrovasculares (ALFRADIQUE, 2009).

A prevalência de DM nos países da América Central e do Sul foi estimada em 26,4 milhões de pessoas e projetada para 40 milhões, em 2030. Nos países

européus e Estados Unidos da América (EUA) este aumento se dará, em especial, nas faixas etárias mais avançadas devido ao aumento na expectativa de vida, enquanto que nos países em desenvolvimento este aumento ocorrerá em todas as faixas etárias, sendo que no grupo de 45 a 64 anos, a prevalência será triplicada e duplicada nas faixas etárias de 20 a 44 anos e acima de 65 anos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012).

No Brasil, dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas mostram que a prevalência de diabetes autorreferida na população acima de 18 anos aumentou de 5,3% para 5,6%, entre 2006 e 2011. Ao analisar esse dado de acordo com o gênero, apesar do aumento de casos entre os homens, que eram 4,4%, em 2006, e passaram para 5,2%, em 2011, as mulheres apresentaram uma maior proporção da doença, correspondendo a 6% dessa população. Além disso, a pesquisa deixou claro que as ocorrências são mais comuns em pessoas com baixa escolaridade (BRASIL, 2010b). Os números indicam que 7,5% das pessoas que têm até oito anos de estudo possuem diabetes, contra 3,7% das pessoas com mais de 12 anos de estudo, uma diferença de mais de 50%. O DM aumenta de acordo com a idade da população: 21,6% dos brasileiros com mais de 65 anos referiram a doença, um índice bem maior do que entre as pessoas na faixa etária entre 18 e 24 anos, em que apenas 0,6% são pessoas com diabetes. Com relação aos resultados regionais da pesquisa, a capital com o maior número de pessoas com diabetes foi Fortaleza, com 7,3% de ocorrências. Vitória teve o segundo maior índice (7,1%), seguida de Porto Alegre, com 6,3%. Os menores índices foram registrados em Palmas (2,7%), Goiânia (4,1%) e Manaus (4,2%) (BRASIL, 2010b).

Diante dos dados epidemiológicos apresentados e das consequências negativas para a saúde pública, é de fundamental importância o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que auxiliem tanto na terapia quanto no melhor entendimento da fisiologia da doença.

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

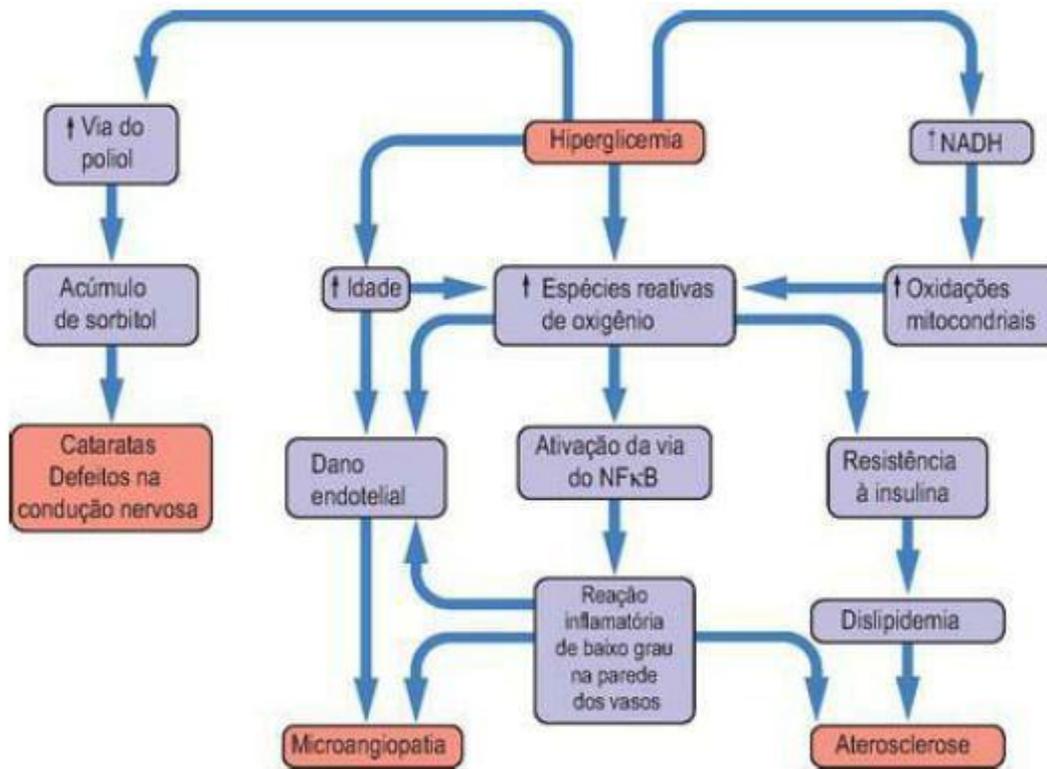
O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a capacidade antioxidante endógena e o seu papel como determinante principal do início e da progressão das complicações cardiovasculares associadas ao DM tem sido alvo de grande interesse (TANIYAMA,

2003). Mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos vasculares à hiperglicemia com indícios de que a capacidade antioxidante endógena esteja prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a remoção dos radicais livres (SANTINI, 1997).

A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (SHAMI, 2004).

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (FIGURA 2). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com conseqüente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL, 2004).

Figura 2 – Mecanismo de desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares do diabetes *mellitus*



Fonte: Baynes (2007).

O controle da glicemia está associado ao desenvolvimento de complicações microvasculares no diabetes tipo 1 e tipo 2 e ao risco cardiovascular aumentado, particularmente no diabetes tipo 2. O estresse oxidativo, a glicosilação de proteínas e a formação de produtos finais de glicosilação são os mecanismos candidatos mais importantes ao desenvolvimento de complicações microvasculares. A hiperglicemia estimula a geração de EROS pelo aumento do fluxo de equivalentes redutores pela cadeia respiratória e pela formação de AGE, que gera EROS em diferentes estágios de seu metabolismo. A toxicidade das EROS está associada ao dano estrutural e funcional em proteínas e aos fenômenos inflamatórios induzidos por meio, por exemplo, da via do NFκB pró-inflamatório. O dano endotelial é particularmente importante. As EROS também interferem na sinalização da insulina, contribuindo para a resistência à insulina. A inflamação e a resistência à insulina são importantes no desenvolvimento de aterosclerose, causando doença macrovascular. De forma importante, o estresse oxidativo aumentado e a inflamação crônica de baixo grau

também têm sido observados na obesidade antes do desenvolvimento de diabetes (BAYNES, 2007).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (GREEN, 2004; KOURY, 2003).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas:

- a) Catalase – Hemoproteína citoplasmática, presente nos principais órgãos, estando especialmente concentrada no fígado e eritrócitos. Sua atividade depende do NADPH. Possui a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Sua localização está nos peroxissomas, tendo por isto ação diminuída em órgãos como o coração, pulmão e o cérebro (possuem pouco peroxissomas). Nestes órgãos a ação antioxidante por esta enzima ocorre quando os radicais livres atingem a circulação sanguínea, através da catalase eritrocitária (BELLÓ, 2002);

Figura 3 – Reação da catalase



Fonte: Belló (2002).

- b) Glutathione peroxidase – É uma família de oxidoreduções filogeneticamente relacionados distribuídos em todos os domínios que vivem. Eles foram nomeados depois da GPx-1, a primeira enzima purificada a partir de células vermelhas do sangue de bovinos que reduz H_2O_2 pela glutathione. Em vertebrados o resíduo ativo redox do GPx é principalmente uma selenocisteína. Estes resíduos fazem parte de um centro ativo fortemente conservado, incluindo Gln, Trp, e Asn. Em GPxS contendo selenocisteína, esta é oxidada e reduzida novamente em dois passos por glutathione, através de um selenodissulfeto misto intermediário. Na maioria dos homólogos de Cys, em vez disso, a cisteína oxidada dá origem a um dissulfeto intramolecular que é reduzido por tioredoxina.

Visto que a redução de hidroperóxido evita a formação de radicais centrados no oxigênio reativas, uma função antioxidante tem sido classicamente atribuído a estas enzimas (URSINI, 2013);

- c) Superóxido dismutase – Foi descoberta em 1968, que uma proteína do eritrócito era capaz de remover cataliticamente os radicais superóxidos e, então, essa função ficou identificada como a da enzima superóxido dismutase (SOD). A SOD é uma metaloenzima que, em sistemas eucarióticos, possui cobre, zinco e manganês e nos procarióticos contém ferro e manganês. Age transformando dois ânions radicais superóxidos em um peróxido de hidrogênio, a qual é uma reação normal em pH fisiológico porém muito acelerada através desta enzima. Possui meia vida curta (menos de 10 minutos) e não penetra nas células. A SOD pode ocorrer de três formas, dependendo do metal associado a ela (Cu e Zn no citoplasma de eucariontes, Mn na matriz mitocondrial e Fe em bactérias) (SANCHÉZ, 2002).

Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (SCHNEIDER, 2004; FERREIRA, 1997).

1.3 TRATAMENTO DO DIABETES 1 E 2

Para o tratamento do DM 1, dois esquemas insulinoterápicos são eficazes em se obter este controle: múltiplas injeções por dia (MID) ou por infusão subcutânea contínua de insulina (ISCI) através de uma bomba infusora. O protocolo de MID inclui um mínimo de 3 a 4 injeções diárias combinando-se insulinas de ação rápida e intermediária ou prolongada (p.ex.: regular e NPH). A ISCI envolve o uso de pequenos equipamentos mecânicos (bombas), no qual se coloca um reservatório ou uma seringa com insulina de ação rápida ou ultrarrápida. Atualmente, o tratamento padrão demanda que o médico utilize uma terapia intensificada para o típico paciente com DM1 que se encontra em boa saúde. E, numa extensão muito maior do que antes, a insulinoterapia deverá ser individualizada e adaptada para o estilo

de vida preferido do paciente. Esse novo tratamento visa instruir o paciente com DM a seguir um padrão alimentar que lhe seja habitual, com ajustes na dose de insulina, ao invés de suscitar a adesão a um programa alimentar e dose de insulina rígidos (HISSA *et al.*, 2001).

Uma vez presente a hiperglicemia em jejum no DM2, onde o tratamento não farmacológico que inclui mudanças de hábitos comportamentais não surte efeito, fármacos de administração oral são utilizados de acordo com seu mecanismo de ação básica (MARCONDES, 2003). Existem cinco grupos de fármacos: estímulo da produção de insulina pelo pâncreas (sulfonilureias e meglitindas), sensibilizadoras da ação da insulina (metformina e tiazolidinedionas) e redutoras de absorção de carboidratos (inibidores da α -glucosidase). (Figura 4)

Figura 4 – Fármacos utilizados no tratamento da DM tipo 2

CLASSE	MECANISMO DE AÇÃO PRINCIPAL	VANTAGEM	EFEITOS COLATERAIS	CUIDADOS
Sulfoniluréias: gliburide glipizide glimepiride	Estimula a secreção de insulina em resposta à refeição.	Baixo custo.	Hipoglicemia Ganho de peso	Contra-indicação relativa em idosos e na presença de insuficiência hepática.
Inibidores da α -glucosidase: acarbose	Bloqueio enzimático da conversão de carboidratos no intestino.	Não causa hipoglicemia.	Flatulência Diarréia Desconforto abdominal	Deve ser ingerido imediatamente antes das refeições.
Meglitínidas: repaglinida nateglinida	Estimula a secreção de insulina estimulada por elevação aguda da glicose.	Baixo risco de hipoglicemia entre as refeições e noturno.	Hipoglicemia se ingerido fora das refeições	Deve ser ingerido somente antes das refeições, com a dose podendo variar de acordo com o conteúdo de carboidrato. Contra-indicada na insuficiência hepática.
Metformina	Diminuição da produção hepática de glicose.	Não causa hipoglicemia. Redução de lípides.	Flatulência Diarréia Desconforto abdominal Raramente acidose láctica	Deve ser ingerido somente antes das refeições. Contra-indicado na presença de insuficiência hepática, renal, cardíaca e respiratória e concomitante com bebidas alcoólicas.
Tiazolidinedionas rosiglitazona pioglitazona	Facilita a captação periférica de glicose.	Não causa hipoglicemia.	Ganho de peso Edema	Contra-indicado na presença de doença hepática ou insuficiência cardíaca. Deve-se monitorar função hepática.

Fonte: Marcondes (2003).

1.4 DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ESTREPTOZOTOCINA

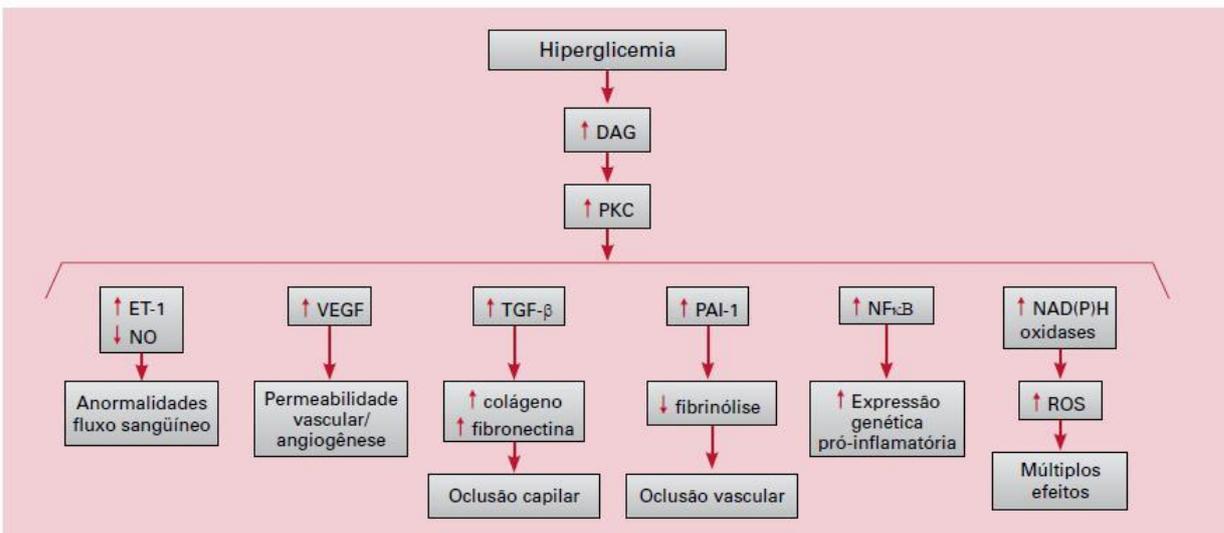
O diabetes pode ser induzido em cobaias através de agentes químicos, infecções virais, administração de dieta específica ou cirurgia (MENDES *et al.*, 2004). A estreptozotocina (STZ) foi descoberta acidentalmente como substância diabética em 1963 e descrita por Rakieten (1963). Esta droga demonstrou ser altamente seletiva para célula beta pancreática, desde então ela tem sido utilizada para produzir diabetes experimental em animais.

A STZ é uma droga derivada da cultura do *Streptomyces acromogenes*, consiste de 2-deoxi-D-glucose com uma cadeia no segundo átomo carbono [2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea)-D-glucopirranose] (HERR *et al.*, 2007). Administração da STZ ocasiona destruição seletiva da célula beta em várias espécies animais.

A STZ induz quebras no DNA a partir de sua decomposição espontânea onde são liberados íons carbono alquilando na posição N⁷ da base guanina e componentes importantes geradores de ATP como as enzimas glicolítica ou mitocondriais causando diminuição na síntese de NAD junto com um maior consumo causado pela ativação da poli (ADP-ribose) sintetase (LE DOUX, 2008).

O diabetes induzido por STZ ativa a via DAG-PKC é importante na regulação da permeabilidade vascular, contratilidade, proliferação celular, angiogênese, ação de citocinas, adesão leucocitária, sendo todas as alterações descritas no diabetes (FIGURA 5).

Figura 5 – Anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia induzida



ET-1 = endotelina-1; NO = óxido nítrico; VEGF = fator de crescimento celular derivado do endotélio; TGF-β = fator transformador do crescimento beta; PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio 1; NFκB = fator nuclear κ-B; NAD(P)[•] = H forma reduzida de NADP[•]; ROS = espécies reativas de oxigênio (12).

Fonte: REIS(2008)

2 LECTINAS

2.1 BREVE HISTÓRICO

No século XIX, iniciou-se o estudo das lectinas a partir de extratos de plantas que apresentavam toxicidade e tinham capacidade de aglutinar eritrócitos. Em 1884, Bruylants e Vennerman demonstraram que essa toxicidade devia-se a uma fração proteica presente na solução aquosa da semente e que precipitava na presença de álcool (MOREIRA, 1991).

Em 1954, o termo lectinas foi introduzido por Boyd e Shapleigh para ressaltar a habilidade exibida por algumas aglutininas de plantas em discriminar eritrócitos, devido a suas reações com resíduos de açúcares expostos (BIES, 2004; HARTLEY, 2004). Devido às lectinas terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos, cada ligação pode resultar em uma variedade de efeitos biológicos (MACHUKA, 1999).

2.2 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Lectina é um termo derivado do latim, *lectus* (escolhido, selecionado), que se refere a sua propriedade de aglutinar eritrócitos de acordo com o grupo sanguíneo ABO (KENNEDY, 1995; MATSUI, 2001). Lectinas são proteínas de origem não imune, que possuem no mínimo um domínio não catalítico e que se ligam reversivelmente e especificamente a um mono ou a um oligossacarídeo (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

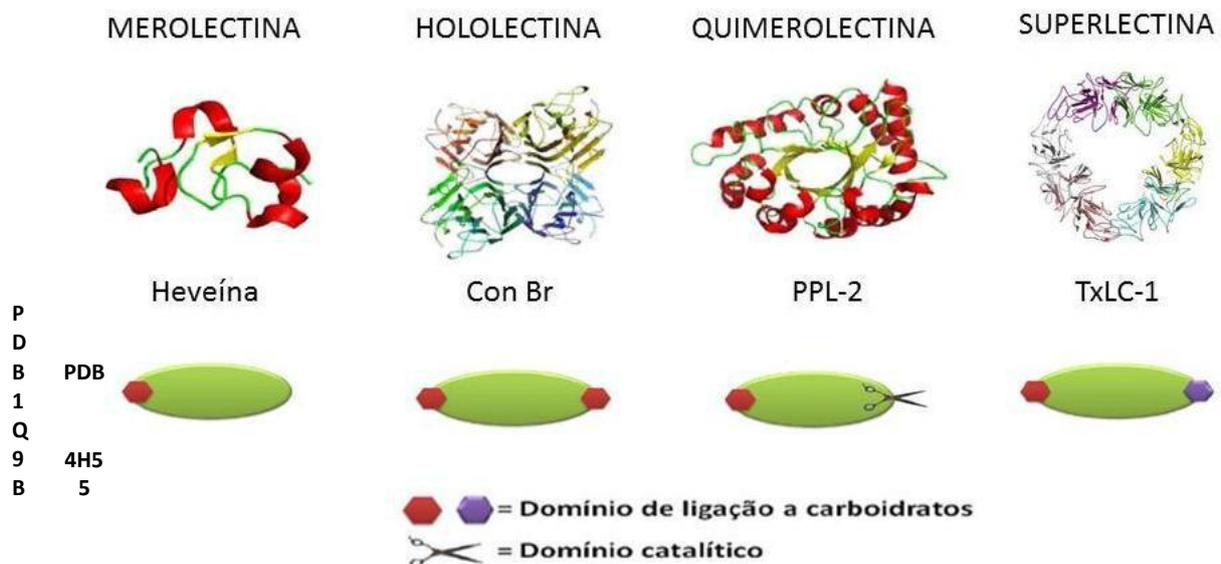
Baseados em critérios estruturais e funcionais, Peumans e Van Damme subdividiram as lectinas em 4 grupos (FIGURA 6):

- a) **Hololectinas:** com múltiplos sítios de ligação a carboidratos, as hololectinas são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Sendo a maioria das lectinas pertencentes a essa classe está representada pelas lectinas de plantas, conhecidas como fitohemaglutininas (PEUMANS *et al.*, 2000);
- b) **Merolectinas:** possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Exemplos

dessa classe são as proteínas tipo-heveína, que se ligam à quitina e as proteínas monoméricas com especificidade por manose, como as lectinas de espécies de orquídeas (VAN PARIJS *et al.*, 1991; VAN DAMME *et al.*, 1994);

- c) Quimerolectinas: possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de apresentarem atividade catalítica (ou outra atividade biológica) associada a outro domínio molecular, portanto, diverso ao sítio de ligação a carboidrato. Como representantes dessa classe, podem ser citadas as RIPs (Proteína inativadora de ribossomo) tipo 2 (PEUMANS *et al.*, 2001);
- d) Superlectinas: No ano de 1996, os autores introduziram uma nova classe de lectinas, as superlectina. Possuindo dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são, estruturalmente, diferentes e reconhecem açúcares não relacionados. A lectina de tulipa TxLC-1 (*first Tulipa hybrid lectin with complex specificity*) é um exemplo desse grupo que possui subunidades com um sítio específico para manose e outro para *N*-acetil-galactosamina, atuando de maneira totalmente independente (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Figura 6 – Classificação estrutural de lectinas



Fonte: Adaptado de Van Damme *et al.* (1998).

2.3 LECTINAS DE ALGAS MARINHAS

No Brasil, as perspectivas de desenvolvimento de Biotecnologias para a indústria farmacêutica ainda são pequenas. No campo da Biotecnologia Marinha, o Brasil começa a apresentar bons resultados nas universidades e centros de pesquisa, em particular, e ainda na descoberta de compostos-candidatos e posterior fase de desenvolvimento pré-clínico. Não há ainda droga brasileira no mercado oriunda de organismos marinhos. No entanto, a existência de grupos que vão se consolidando na bioprospecção da diversidade marinha começam a revelar o nosso potencial na área (BRASIL, 2010a). As potencialidades de aplicação da Biotecnologia no campo da saúde são muitas e tem atraído a atenção e o interesse de cientistas, indústrias, investidores privados e gestores de políticas públicas em todos os países (REIS *et al.*, 2009).

Os produtos naturais têm sido a maior fonte de inspiração para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas e, entre elas, a produção de fármacos. Do analgésico morfina, ao antibiótico penicilina, passando pelo anticâncer paclitaxel (Taxol®), estima-se que 80% dos fármacos em uso são produtos naturais ou foram inspirados pela natureza (COSTA-LOTUFO, 2009).

Os metabolitos encontrados em algas são descritos como possuidores de atividade anti-inflamatória, antimutagênico, antitumoral, antidiabética e propriedades anti-hipertensivas. Além disso, eles são hepatoprotetores e também podem inibir a lipoxigenase, aldose redutase e colinesterases (EL GAMAL, 2010; LOPES *et al.*, 2012; PANGESTUTI; KIM, 2011; YOON *et al.*, 2008; ZUBIA *et al.*, 2009a; ZUBIA *et al.*, 2009b).

Lectinas de algas marinhas diferem daquelas de vegetais em varias propriedades, sendo em geral apresentadas por pequena massa molecular e não reconhecem açúcares simples, tornando-as mais específicas para oligossacarídeos complexos. Produtos naturais marinhos tem mostrado uma interessante diversificação de estruturas químicas novas com atividades biológicas diferentes (KONIG; WHIGHT, 1996). Muitas destas não precisam de cátions divalentes para

exercer suas atividades biológicas (ROGERS; HORI, 1993). Existem vários trabalhos mostrando a atividade antioxidante a partir de substâncias bioativas de algas marinhas (VIDAL *et al.*, 2006; ZUBIA; ROBLEDO; FREILE-PELEGRIN, 2007; ROCHA *et al.*, 2007).

Taxonomicamente é da classe *Florideophyceae*, família *Rhodomelaceae*, gênero *Bryothamnion* e espécie *Bryothamnion triquetrum* (SGGmelin) MA Howe (ALGAEBASE, c2015). As algas da espécie *Bryothamnion triquetrum* são compostas de talo ereto, rígido, grosseiro, de coloração vermelho escura, medindo até 15 cm, crescendo de forma geral, rapidamente em ambientes de pouca profundidade fixa ao substrato, não apresentando toxicidade e sendo amplamente distribuída (ARECES, 1995), essas algas apresentam também atividade antioxidante semelhante ao ácido ascórbico e α -tocoferol, pois seu extrato possui três constituintes fenólicos principais: ácido trans-cinâmico, o ácido p-cumárico, e o ácido ferúlico, estes são capazes de sequestrar o radical hidroxila, ânion superóxido e radical DPPH, além de inibir a lipoperoxidação (VIDAL, 2006; ZUBIA; ROBLEDO; FREILE-PELEGRIN, 2007).

Ainouz *et al.*, em 1995, apresentaram estudos sobre atividade aglutinante presentes nas lectinas de algas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii*, sendo a BTL uma proteína nativa monomérica de massa molecular menor que 10 kDa. A sequência de aminoácidos da BTL foi estabelecida após a análise da sequência N-terminal de conjuntos de sobreposição de peptídeos obtidos por digestão proteolítica. Quando a sequência de aminoácido da BTL foi comparada com outras sequências de proteínas depositadas em bases de dados públicas, sendo que nenhuma similaridade foi encontrada, sugerindo fortemente que esta pertence a uma nova família de lectinas (CALVETE *et al.*, 2000). Em 2001, Neves avaliou com positividade a atividade pró-inflamatória *in vivo* e *in vitro* principalmente pela estimulação da migração de neutrófilos. Vieira e colaboradores, em 2004, identificaram a atividade antinociceptiva destas lectinas.

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE LECTINAS

Por exercerem variadas funções dentro de sistemas biológicos, as lectinas projetam uma grande aplicabilidade funcional como ferramenta biotecnológica, uma vez que praticamente todas as membranas biológicas e paredes celulares contêm glicoconjugados, todos os organismos vivos podem ser estudados a partir de lectinas, contribuindo para o aumento da construção do campo de estudo lectínico exibindo uma notável relevância devido ao crescimento de trabalhos científicos. (CAVADA *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2010).

Lectinas foram descritas por possuírem atividades biológicas de importância clínica: inibição da formação de biofilmes bacterianos (TEIXEIRA *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2014); inibição de leveduras patogênicas (CORDEIRO *et al.*, 2006); atividade de células de sistema imune (LOPES *et al.*, 2005; PEREIRA-DASILVA *et al.*, 2006; ALENCAR *et al.*, 2007); atividade específica anti-HIV (AKKOUH *et al.*, 2015); ferramentas para detecção de células neoplásicas (PINTO *et al.*, 2010); alvos terapêuticos e entrega de drogas em seu sítio de ação (BIES *et al.*, 2004); atividade pró-cicatrizante (NETO *et al.*, 2011); efeito anti e pró-inflamatório (MOTA *et al.*, 2006).

Lectina de *Amansia multifida*, foi estudada por Neves *et al* (2007) como proteína de atividade antinociceptiva de origem central e periférico. Lima e colaboradores (2004) descreveram a atividade da lectina de BTL com como indutora de relaxamento dependente do endotélio da aorta de ratos através de liberação de óxido nítrico.

Existe uma lacuna a ser preenchida sobre o emprego da lectina de BTL em atividades biológicas, principalmente sobre a atividade antihiperlipidêmica, pois já é sabido que algas marinhas possuem atividades antioxidantes já demonstradas nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, processo este crucial para o desenvolvimento e complicações do diabetes e síndrome metabólica.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o potencial da lectina isolada da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* como agente antihiperlipidêmico e antioxidante.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Induzir diabetes nos animais experimentais;
- b) Avaliar a ação da lectina de *Bryothamnion triquetrum* no processo de atividade antihiperlipidêmica e antioxidante em Wistar;
- c) Investigar a associação de estudos histopatológicos diante do perfil bioquímico e enzimático antioxidante;
- d) Propor nova abordagem para o tratamento de diabetes avaliando a lectina de *Bryothamnion triquetrum* como um promissor insumo biotecnológico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Lectina

A lectina de *Bryothamnion triquetrum* (BTL) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Celso Nagano, coordenador do Laboratório de Espectrometria de Massas – LEMAP/BIOMOL GROUP e pelo Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio, coordenador do Laboratório Biomar. O isolamento e purificação da lectina foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Ainouz e colaboradores (1995).

4.1.2 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (n=24) entre 8 e 10 semanas de vida, machos pesando aproximadamente 300g cedidos pelo Biotério Central – UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, de acordo com seu grupo, na hospedaria para animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – Campus Porangabussu, durante os procedimentos experimentais, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura 25 ± 2 °C e umidade $55\pm 10\%$) com fornecimento de água e ração específica à vontade, exceto nos dias anteriores aos procedimentos onde foi necessário jejum.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Indução do Diabetes por Estreptozotocina (STZ)

O diabetes foi induzida baseada no protocolo de Da Delfino et al (2002), onde estreptozotocina (Sigma® S-130) foi administrada via intraperitoneal seguindo a dose de 60mg/kg de peso corporal diluído em tampão citrato (0,1M pH 4,5). Este modelo provoca diabetes por um longo período de tempo chegando até 40 semanas. Após 3 dias da indução, a glicose sérica foi aferida por punção superficial da veia da

cauda e analisada com o glicosímetro Accu-Chek Active (Roche®). Animais com níveis de glicose superiores a 200mg/dl de glicose foram considerados diabéticos.

4.2.2 Tratamento

Antes do inicio do tratamento, os animais foram aleatoriamente divididos e organizados em 4 grupos (n= 6), de acordo com o tratamento/tipo solução aplicada: 1, Salina (NaCl 0,15M); 2, Glibenclamida 600µg/kg; 3, Lectina de *Bryothamnion triquetrum* (BTL) 600µg/kg; 4, Lectina de *Bryothamnion triquetrum* (BTL) 900µg/kg. Todas as soluções, acima citadas, utilizadas para tratamento foram diluídas em veículo líquido, NaCl 0,15M, também utilizado como grupo controle negativo, em respeito a isotonicidade fisiológica celular dos animais. A Glibenclamida foi utilizada como grupo controle positivo, pois é a droga de primeira escolha para o tratamento do diabetes. Os animais foram tratados diariamente no mesmo horário de acordo com os grupos abaixo (TABELA 1):

Tabela 1 – Distribuição dos grupos de animais de acordo com tratamento

Grupos	Tratamento	Volume (µl)
1	Salina (NaCl 0,15M)	600
2	Glibenclamida 600µg/kg	600
3	Lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> (BTL) 600µg/kg	600
4	Lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i> (BTL) 900µg/kg	600

0 s a
 1 Cl
 0,
 15
 M)

 Gli
 be
 nc
 la
 G mi
 ru Di da
 p ab 60
 o éti 0μ 30
 0 co g/ 0
 2 s kg μl*

 G B
 ru Di TL
 p ab 60
 o éti 0μ 30
 0 co g/ 0
 3 s kg μl*

 G B
 ru Di TL
 p ab 90
 o éti 0μ 30
 0 co g/ 0
 4 s kg μl*

*Veículo – Salina (NaCl 0,15M)
 Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.3 Testes bioquímicos

As coletas do sangue foram realizadas nos dias 7, 14 e 21 após a confirmação da hiperglicemia através de punção da veia da cauda do animal utilizando seringa de 1 mL heparinizada e tubo com ativador de coágulo. Para obtenção do soro a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos, sendo acondicionado sob refrigeração e transportado para análise. Foram analisados os parâmetros séricos de glicose, triglicérides, colesterol total, na automação Konelab 60i (WienerLab[®]) com seus respectivos kits. A partir da lise eritrocitária foram analisadas as enzimas GPx, SOD e CAT.

4.2.3.1 Glutationa peroxidase (GPx)

A atividade Glutationa peroxidase (GPx) foi determinada em eritrócitos utilizando o Kit RANSEL[®] (Randox Laboratories, Reino Unido), de acordo com o método descrito por Paglia e Valentine (1967). A atividade da GPx foi expresso como UI/mg de proteína

4.2.3.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) foi medida em eritrócitos utilizando o Kit RANSOD[®] (Randox Laboratories, Reino Unido). Este método emprega xantina e xantina oxidase para produzir radicais superóxido que reagem com o ácido 2- (4 - iodofenil) -3- (4 - nitrofenil) -5- cloreto de feniltetrazol (INT) para formar o composto de formazan vermelho. A atividade superóxido dismutase foi medida pelo grau de inibição desta reação a 505 nm. A atividade de SOD foi expressa em IU/mg de proteína.

4.2.3.3 Catalase (CAT)

A atividade da enzima foi medida através do método descrito por Aebi (1984). Eritrócitos foram hemolisados pela adição de 100 volumes de água destilada e, em seguida, 20µl desta amostra de hemolisado foi adicionado a uma cubeta e a reação foi iniciada pela adição de 100 uL de H₂O₂ a 300 mM recentemente preparada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0 para dar um volume final de 1 mL. A taxa de H₂O₂ decomposição foi medida em espectrofotômetro a 240 nm durante 120 segundos. A atividade de CAT foi expressa como UI/mg de proteína.

4.2.4 Avaliação Histopatológica

Para a análise histológica, no ultimo dia do experimento os animais foram sedados, anestesiados e sacrificados para excisão do pâncreas e fígado. Os órgãos foram fixados em formaldeído 10%v/v preparado em tampão PBS 0,01 M, pH 7,2. Estas amostras foram submetidas a processamento histológico de rotina e incluídas

em parafina. Após microtomia, os cortes feitos em secções de 5 µm foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) (MICHALANY, 1991).

4.2.5 Análise estatística

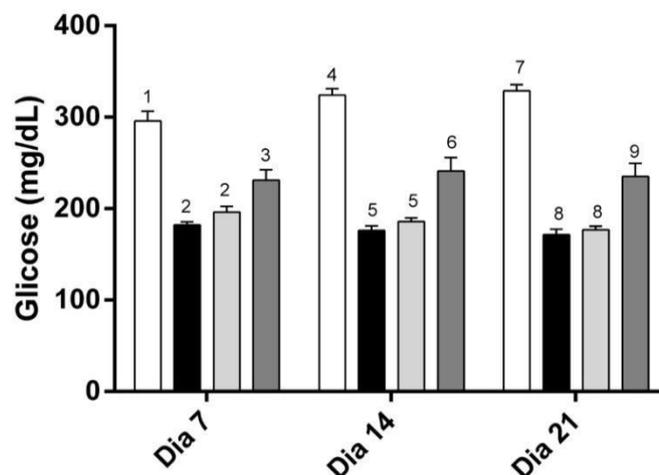
Para a avaliação dos dados obtidos através das análises bioquímicas, utilizou-se o teste de análise de variância (one-way ANOVA) com o pós-teste de Tukey presentes no pacote estatístico GraphPad Prism® versão 6.00 para Microsoft Windows®, considerando estatisticamente significante $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, observou-se que a lectina de *Bryothamnion triquetrum* em suas duas concentrações (600µg/kg, 900µg/kg), não apresentou toxicidade sobre os animais experimentais quando administrada por via oral. Benevides (2008) investigou o extrato de *Bryothamnion triquetrum* que apresentou toxicidade de 75% quando administrada por via intraperitoneal em ratos apresentando convulsão no prazo de 8-20 horas (BENEVIDES *et al.*, 1998).

Nos grupos em que foi administrada BTL observou-se uma redução significativa dos níveis séricos de glicose durante todos os dias de avaliação quando comparado com o controle negativo. Interessantemente, o grupo tratado com BTL na concentração de 600 µg/kg apresentou padrão semelhante ao grupo onde a droga comercialmente considerada como padrão-ouro para diabetes (glibenclamida 600 µg/kg) foi administrada. A dose de 900 µg/kg da lectina apresentou eficácia e eficiência diminuída quando comparada com a concentração de 600 µg/kg e aumentada frente ao grupo NaCl 0,15 M quando comparada ao grupo BTL 600 µg/kg e ao grupo tratado com Glibenclamida na mesma concentração. Os resultados do grupo NaCl 0,15 M mostraram estar de acordo com o esperado para o tipo de tratamento em relação ao diabetes, mantendo os níveis de glicose aumentados (FIGURA 7).

Figura 7 – Níveis de glicemia em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática.



Notas: 1 Valores médios apresentados \pm desvio padrão.

2 Números iguais sobre as barras significam que não existe significância estatística. $p < 0.05$.

3 Legenda: NaCl 0,15 M, Glibenclamida 600 µg/kg, BTL 600 µg/kg, BTL 900 µg/kg.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar de a literatura carecer de dados experimentais acerca da atividade antihiperlipidêmica de lectinas de algas marinhas e até mesmo daquelas isoladas de vegetais, observa-se que a lectina isolada das sementes de *Canavalia ensiformis* apresentou efeito insulina mimético em modelo *in vitro*. De acordo com os dados apresentados por Cavada e colaboradores (2003) mudanças estruturais e de conformação podem modular a capacidade das lectinas em se ligar ao receptor de insulina e são responsáveis por suas distintas capacidades para desencadear a fosforilação do receptor. *In vitro*, em microsomas hepáticas as lectinas de ligação manose-glucose: *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea virgata*, *Dioclea rostrata*, e *Cratylia floribunda* estimularam a fosforilação do receptor de insulina em um modo dose dependente, porém diferenciados quanto a eficiência e potência, não produzindo inibição sistemática da ligação de insulina ao receptor propondo um ligação em região diferente ao sítio de ligação da insulina.

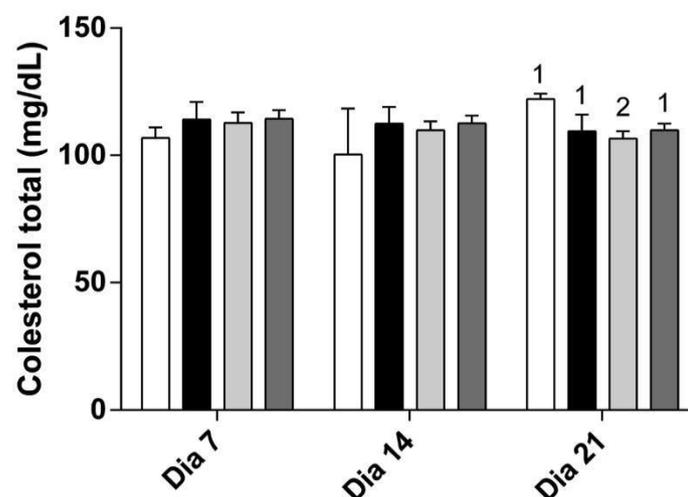
Numerosos mecanismos de ação são propostos para explicar a atividade insulinomimética de alguns compostos extraídos de espécies vegetais. Assim, pode-se acreditar que a BTL por ser uma proteína de baixo peso molecular pode se ligar a regiões glicosiladas do receptor de insulina, as quais é diferente daquela utilizada pela insulina durante a execução de seu papel.

Abdel-Sattar *et al* (2011) demonstrou que o extrato metanólico de *Viscum schimperi* reduziu os níveis de glicose, sugerindo que pode haver um efeito semelhante à insulina em tecidos periféricos, provavelmente causado por estimulação e potenciação da liberação de insulina pelas células beta remanescentes nas ilhotas de Langerhans, causando aumento da insulina no plasma em ratos tratados com STZ. Este efeito de *V. schimperi* parece ser semelhante ao da glibenclamida que induz a exocitose da insulina a partir de células beta. Produtos naturais extraídos de *V. album*, incluindo lectinas, já demonstraram atividade de liberação da insulina, o que pode contribuir para o estabelecimento antidiabético relatado para esta planta (GRAY; FLATT, 1999). Resultado semelhante foi relatado por Kang e colaboradores (2010) onde foi utilizado extrato da alga marrom *Ecklonia cava* na diminuição do nível de glicose no plasma e aumento da concentração plasmática de insulina no diabetes mellitus 1 induzida por STZ. Nwosu *et al* (2011), também relataram atividade antiproliferativa e antidiabetogênica a partir de extratos de algas marrons comestíveis. Uma das maiores vantagens do

tratamento com compostos de algas é que estes apresentam uma boa biodisponibilidade oral, e isso faz com que sejam uma fonte valiosa para o desenvolvimento de novas drogas como, por exemplo, os derivados de floroglucinol que apresentam uma forte atividade de inibição da α -glucosidase em concentrações nano molares, além de apresentar uma potente atividade antihiperlipidêmica em modelos animais (RENGASAMY, 2014). Estes trabalhos corroboram com os resultados obtidos com BLT 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tais resultados podem ser comparados ao grupo tratado com glibenclamida podendo provavelmente ter mesmo mecanismo de ação da droga. As terapias convencionais para diabetes apresentam muitos efeitos colaterais e alta taxa de falência secundária. Por outro lado, espera-se que extratos e moléculas vegetais tenham eficácia semelhante com menos efeitos secundários do que as drogas convencionais (KIMURA, 2006).

Algumas alterações metabólicas são resultantes do aumento da glicemia sérica, como por exemplo, alterações nos níveis de colesterol total, que neste estudo foi mensurado em todos os grupos testados. Os resultados obtidos demonstram que não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos testados (NaCl 0,15M, BTL 600 e 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e Glibenclamida) nos dias 7 e 14. Por outro lado, no dia 21 o grupo tratado com BTL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentou uma diminuição significativa nos níveis de colesterol total quando comparado aos demais grupos (FIGURA 8).

Figura 8 – Níveis de colesterol total em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática



Notas: 1 Valores médios apresentados \pm desvio padrão.

2 Números iguais sobre as barras significam que não existe significância estatística. $p < 0,05$.

3 Legenda: NaCl 0,15 M, Glibenclamida 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, BTL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, BTL 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

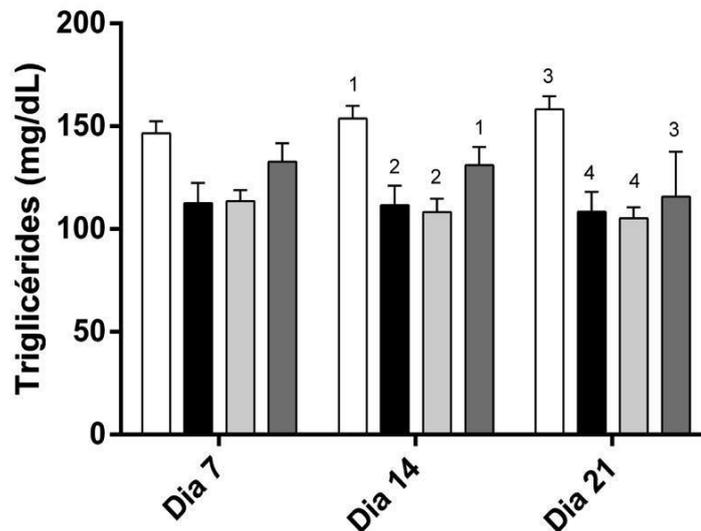
Hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia são complicações da diabetes mellitus bem conhecidos, são resultantes de alterações no metabolismo lipídico caracterizadas por níveis elevados de colesterol, triglicérides, VLDL e LDL (ONUNOGBO *et al.*, 2012). Isso poderia explicar os níveis alterados nos ratos onde não foi feita a administração de BTL 600 µg/kg, dose esta que obteve melhor resultado quando comparado aos demais tratamentos e ao grupo controle negativo, sugerindo modulação pela via de sinalização da insulina como proposto por Vecina e colaboradores (2014) ao administrar o extrato da alga verde *Chlorella pyrenoidosa* em camundongos. Contudo, o autor destaca que não se sabe qual composto do extrato possui capacidade de interação com o receptor específico de insulina promovendo o desencadear da via metabólica, ou se há uma interação sinérgica entre eles que ative esta cascata de sinalização (VECINA *et al.*, 2014).

Sendo a hipertrigliceridemia a alteração mais frequente nos distúrbios lipídicos, os níveis séricos de triglicérides foram mensurados em todos os grupos testados. BTL mostrou potencial inibitório da hipertrigliceridemia, uma vez que foi observada uma diminuição dos níveis de triglicérides nos dias 7, 14 e 21 no grupo tratado com 600µg/kg, resultado semelhante ao obtido no tratamento com Glibenclamida a 600µg/kg. Entretanto, o grupo tratado com BTL a 900µg/kg não foi observada diminuição nos níveis de triglicérides quando comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M) (FIGURA 10).

A atividade antihipertrigliceridêmica já foi demonstrada em Functional... (2013) utilizando extratos de algas marinhas marrons ricas em fucoxantina, carotenóide capaz de dissipar a energia através da oxidação de ácidos graxos e produção de calor. Além disso, tais extratos ajudam a diminuir a resistência à insulina e melhora os níveis de glicose no sangue, beneficiando a prevenção da síndrome metabólica. A alga marrom *Ecklonia stolonifera* é um recurso muito interessante no que diz respeito a atividade antihipertrigliceridêmica, uma vez que seus derivados florotanino originais apresentam atividade anti-adipogênica através da inibição da diferenciação de adipócitos e formação de lipídeos em adipócitos murino 3T3-L1 (JUNG *et al.*, 2014). Além disso, Kim e Kim (2012) demonstraram que o extrato da alga *Ecklonia cava* apresenta efeito significativo na diminuição das

concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e esteatose hepática quando administrado em ratos com diabetes induzida intraperitonealmente por STZ.

Figura 9 – Níveis de triglicérides em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática.



Notas: 1 Valores médios apresentados \pm desvio padrão.

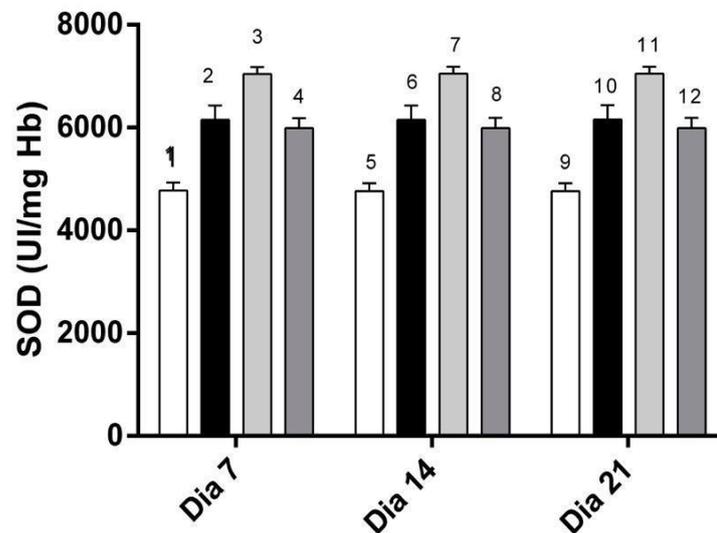
2 Números iguais sobre as barras significam que não existe significância estatística. $p < 0.05$.

3 Legenda: NaCl 0.15 M, ■ Glibenclamida 600 µg/kg, ■ BTL 600 µg/kg, ■ BTL 900 µg/kg

Fonte: Elaborada pela autora.

Resultados obtidos através da determinação da atividade superóxido dismutase mostraram que os grupos tratados com BTL (600 e 900 µg/kg) e Glibenclamida (600µg/kg) apresentaram atividade enzimática significativamente maior em todos os dias de avaliação quando comparada ao controle negativo. Vale ressaltar que o grupo BTL 600µg/kg apresentou a maior atividade superóxido dismutase quando comparado aos demais grupos (FIGURA 10).

Figura 10 – Níveis de atividade superóxido dismutase (SOD) em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática.



Notas: 1 Valores médios apresentados \pm desvio padrão.

2 Números iguais sobre as barras significam que não existe significância estatística. $p < 0.05$.

3 Legenda: NaCl 0.15 M, Glibenclamida 600 µg/kg, BTL 600 µg/kg, BTL 900 µg/kg

Fonte: Elaborada pela autora.

O grupo BTL 600µg/kg obteve resultado superior quando comparado ao resultado do grupo Glibenclamida 600µg/kg, visto que, é a droga de primeira escolha. Em geral, as algas são consideradas uma rica fonte de antioxidantes. Os compostos antioxidantes provenientes de algas vermelhas têm sido identificados como alguns pigmentos (astaxantina carotenoide, por exemplo) (HEO *et al.*, 2005). Polifenóis naturais são abundantes constituintes de origem vegetal, especialmente em algas. Até ao momento, milhares de polifenóis foram descobertos em produtos naturais. Os dois tipos principais de polifenóis são os flavonóides e ácidos fenólicos (LI *et al.*, 2009). Muitos pesquisadores têm mostrado que florotanino derivados de algas marinhas marrons tais como *E. cava*, *E. kurome*, *E. bicyclis*, e *H. fusiformis* têm fortes atividades antioxidante contra os danos dos radicais livres mediada por oxidação, mostrando efeitos protetores contra hidrogênio induzindo dano por peróxido na célula (KANG, 2005a, 2005b, 2006).

A análise antioxidante de bromofenóis sugere um papel importante desta classe de substâncias como fatores de radical livre e reflete o valor da pesquisa em antioxidantes naturais de algas vermelhas marinho da família Rhodomelaceae como,

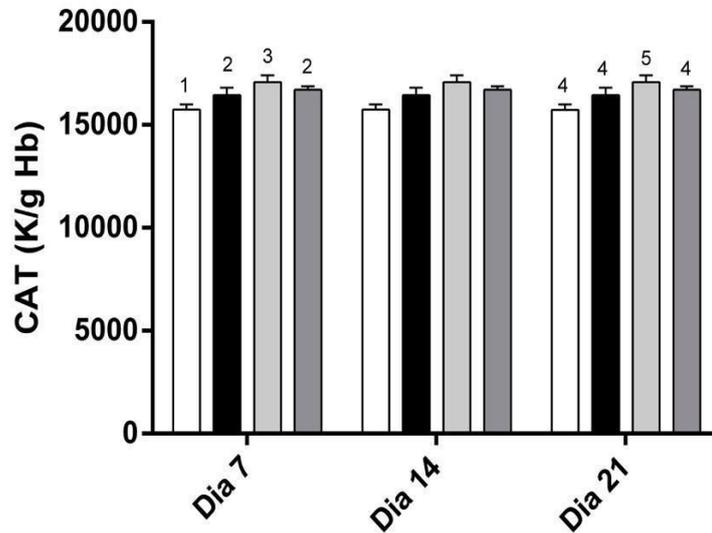
por exemplo, a alga marinha vermelha *R. confervoides* (LI, 2008). Extratos metanólicos de *Euchema kappaphycus* e *Acanthophora spicifera* produziram um alto poder redutor de enzimas oxidantes mediante dose dependência quando comparados a suas frações, indicando que o extrato possui interações entre seus constituintes que os torna um composto potencial para aplicações médicas (GANESAN; KUMAR; BHASKAR, 2008).

Taninos do vegetal *Ficus racemosa* mostraram restauração significativa mediante a atividade das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e reduziu a glutathione peroxidase e glutathione, restaurando assim a capacidade antioxidante dos órgãos a níveis quase normais (VELAYUTHAM; SANKARADOSS; AHAMED, 2012). Lectinas de *Bryothamnion triquetrum*, por serem provenientes de algas vermelhas, provavelmente possuem mesmo potencial antioxidante das demais espécies de mesma família descritas anteriormente. Rocha (2015) relatou sobre interação entre o resveratrol e ConM e fornecendo evidência de que estas duas moléculas podem atuar sinergicamente para reduzir o processo inflamatório causados por processos oxidantes.

No que diz respeito a atividade enzimática da catalase, os grupos tratados com BTL (600 e 900 µg/kg) e Glibenclamida (600 µg/kg) apresentaram atividade enzimática significativamente maior no 7º dia de avaliação quando comparada ao controle negativo. Vale ressaltar que o grupo BTL 600 µg/kg apresentou a maior atividade enzimática quando comparado com os demais grupos. Por outro lado, no 14º dia de avaliação não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos testados, e apenas BTL 600 µg/kg mostrou atividade enzimática significativamente maior que o grupo controle, (FIGURA 11).

Esta alteração também pode ser visualizada nos níveis de GPx dos grupos Glibenclamida 600µg/kg, BTL 600 µg/kg, BTL 900µg/kg, que apresentaram aumento significativo da atividade enzimática em todos os dias de avaliação quando comparados ao grupo NaCl 0,15M, tendendo a manter seus níveis médios no dia 21 (FIGURA 12).

Figura 11 – Níveis de catalase (CAT) em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática



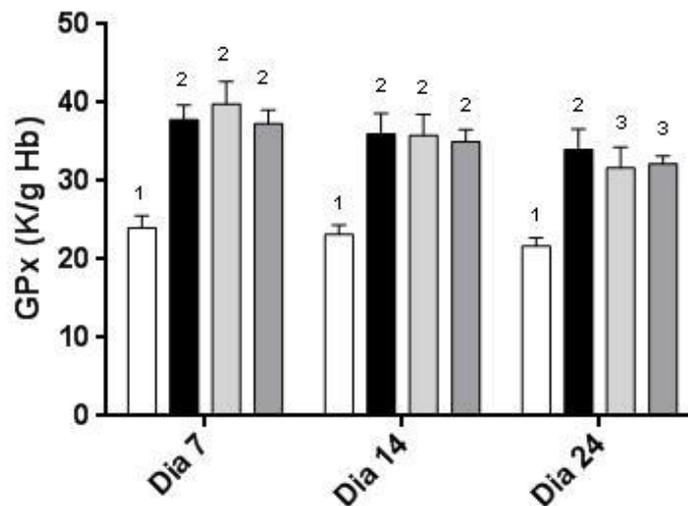
Notas: 1 Valores médios apresentados \pm desvio padrão.

2 Números iguais sobre as barras significam que não existe significância estatística. $p < 0.05$.

3 Legenda: NaCl 0.15 M, Glibenclamida 600 µg/kg, BTL 600 µg/kg, BTL 900 µg/kg

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 – Níveis de glutatona peroxidase (GPx) em jejum aferidos nos dias 7, 14 e 21 após a indução do diabetes e mensurados por meio do método da glicemia enzimática



Notas: 1 Valores médios apresentados \pm desvio padrão.

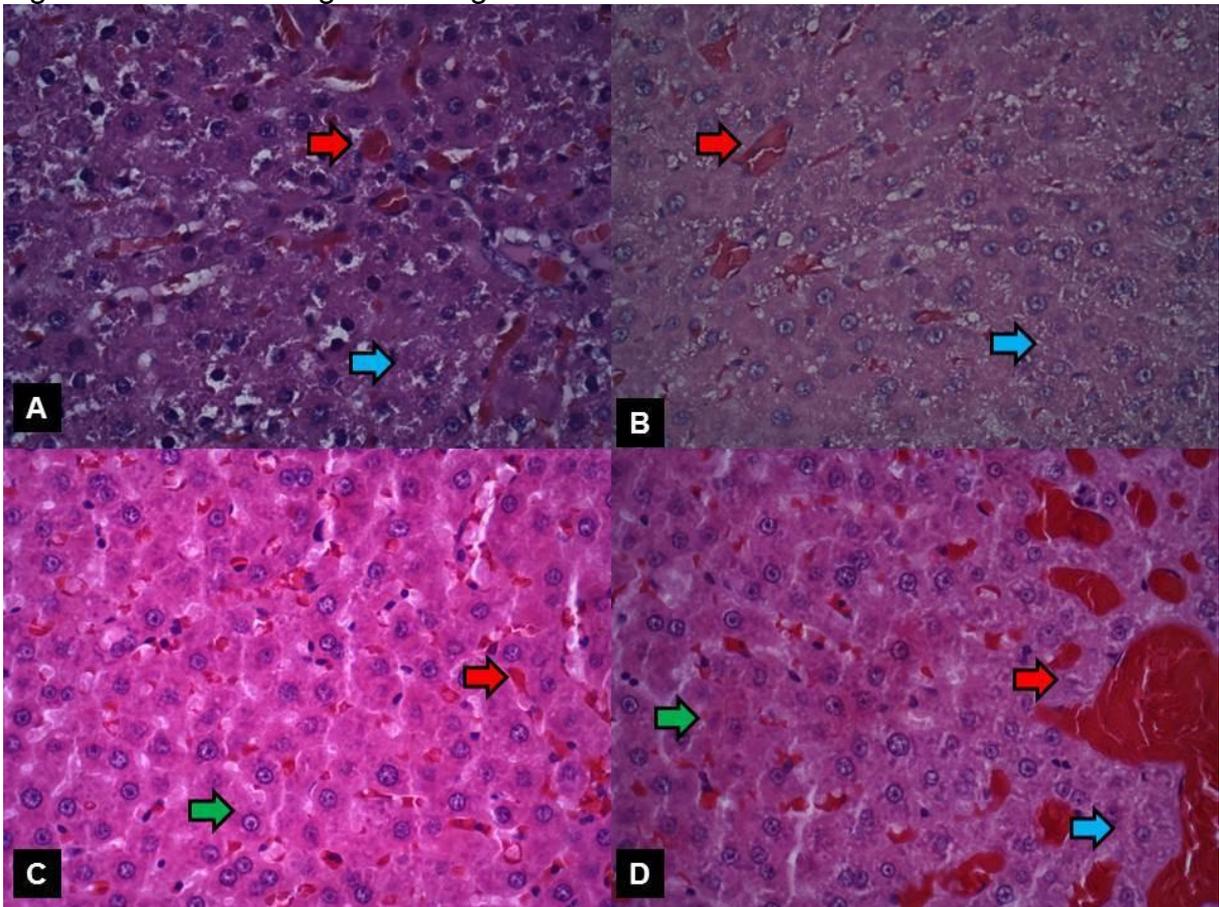
2 Números iguais sobre as barras significam que não existe significância estatística. $p < 0.05$.

3 Legenda: NaCl 0.15 M, Glibenclamida 600 µg/kg, BTL 600 µg/kg, BTL 900 µg/kg

Fonte: Elaborada pela autora.

A avaliação histopatológica do fígado do grupo NaCl 0,15M, demonstrou que houve alteração morfológica citoplasmática considerável ocorrendo a presença de granulações inespecíficas e regular congestão de sinusóides. No grupo Glibenclamida 600 µg/kg, houve uma leve congestão dos sinusóides hepáticos e leve alteração com presença de granulação no citoplasma. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os achados de Silva (2011) em que relata a diminuição do espaço ocupado pelas ilhotas dentro do pâncreas exócrino sugerindo que a dose de STZ provocou diabetes tipo 1 no animal. Com a administração de BTL 600 µg/kg, os achados foram mais significativos por apresentarem preservação celular com ausência de granulação citoplasmática que se suspeita ter havido uma proteção mitocondrial conferida pela lectina, dados estes corroboram com os testes bioquímicos e dosagem enzimática, onde foi visualizada discreta congestão nos sinusóides. Na concentração 900 µg/kg de BTL, foi observada leve congestão e presença de poucas células com leve alteração citoplasmática sendo que as células bem preservadas perfazem um maior número (FIGURA 13). A indução de diabetes por STZ causaram danos principalmente no pâncreas (FIGURA 14), sobretudo por reduzir o tamanho da ocupação das ilhotas de Langherans dentro do pâncreas exócrino e, por consequência, a quantidade de células que secretam hormônios sinalizadores para controle glicêmico, em especial as células betas que são responsáveis pela liberação de insulina. O grupo tratado com salina apresentou diminuição do tamanho da ilhota com diminuição bastante acentuada da celularidade endócrina, dados similares foram anteriormente relatados por Pereira (2014). A administração de BTL na concentração de 600 µg/kg apresentou proteção a danos de grande proporção das ilhotas quando comparados aos demais grupos com aumento de celularidade de pâncreas endócrino, dados estes que corroboram com resultados relatados por Antu (2014)

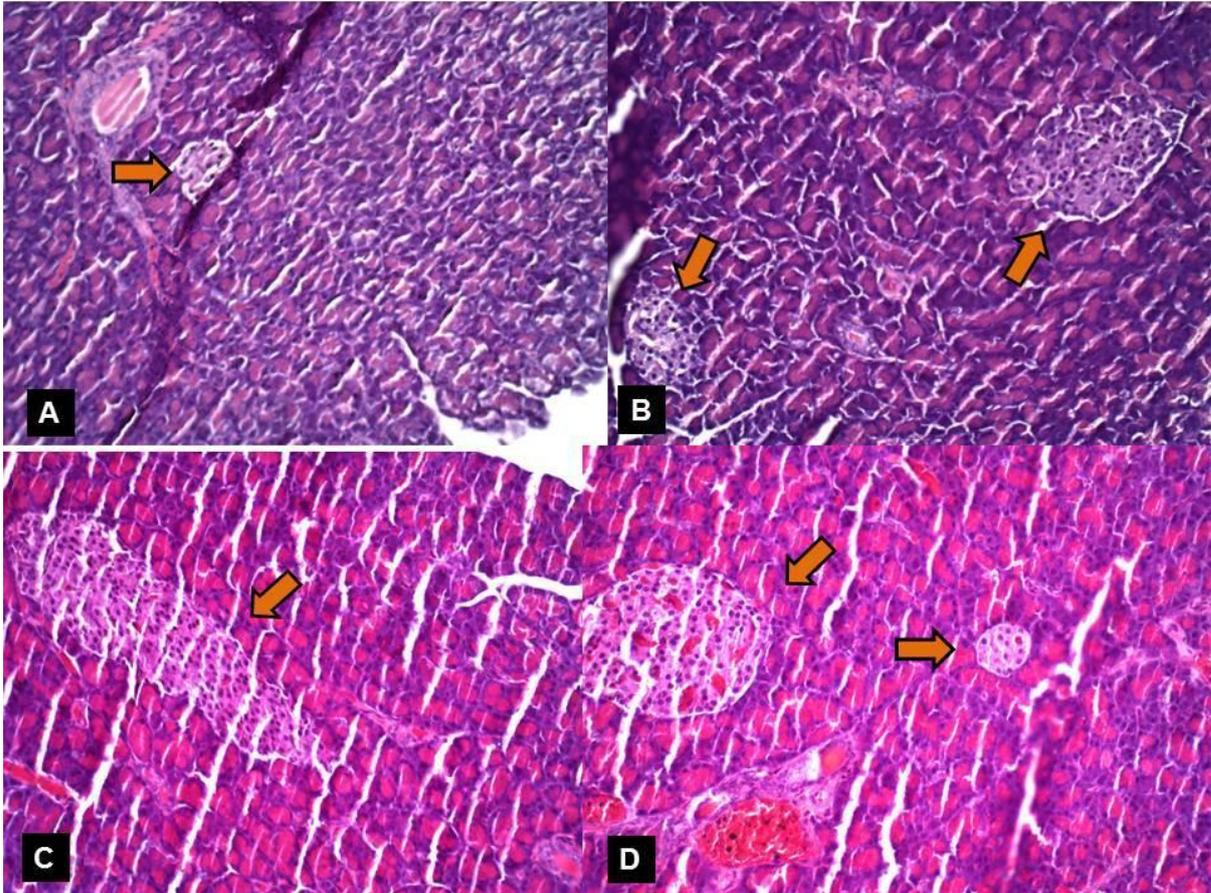
Figura 13 – Fotomicrografia de fígado



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: (A) Grupo controle negativo, (B) Grupo controle positivo, (C) BTL 600 µg/kg, (D) BTL 900 µg/kg. Presença de espessamento de sinusoides por congestão (seta vermelha) e granulação citoplasmática (seta azul), hepatócitos bem preservados (seta verde).

Figura 14 – Fotomicrografia de pâncreas



Fonte: Elaborada pela autora

Legenda: (A) Grupo controle negativo, (B) Grupo controle positivo, (C) BTL 600 µg/kg, (D) BTL 900 µg/kg. Setas em laranja indicam ilhotas de Langerhans.

6 CONCLUSÃO

- └ A lectina isolada da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* (BTL) estimula a produção de enzimas antioxidantes, agindo sobre os tecidos hepáticos e pancreáticos, atuando também na diminuição da hiperglicemia, hiperlipidemia e alterações morfológicas causadas pelo diabetes induzido por estreptozotocina.

- └ O efeito antihiperglicêmico e antioxidante da BTL assemelharam-se ao tratamento com a Glibenclamida, porém estudos mais específicos deverão ser realizados para confirmar os prováveis mecanismos de ação desta lectina na interação com o receptor de insulina ou outra estrutura.

- └ O exame histopatológico deste estudo em conjunto com o perfil bioquímico e enzimático sugere que a proteção tecidual ocorre por diminuição do processo oxidativo.

- └ Estudos histopatológicos mais específicos como a imunohistoquímica serão de grande auxílio para somar valores aos dados já obtidos, podendo assim obter mais informações sobre internalização (ou não) da lectina nas células do pâncreas e do fígado onde houve uma excelente proteção celular.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-SATTAR, E. A. *et al.* Antihyperglycemic and hypolipidaemic effects of the methanolic extract of Saudi mistletoe (*Viscum schimperi* Engl.). **J. Advan. Res.**, [S.l.], v. 2, p. 171-177, apr. 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/M0HzEL>>. Acesso em: 13 dez. 2014.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, [S.l.], v. 105, p. 121-126, 1984. Disponível em: <<http://goo.gl/Rj4TBX>>. Acesso em: 22 dez. 2014.
- AINOUZ, I. L. *et al.* Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, [Campinas], v. 7, n. 1, p. 15-19, 1995. Disponível em: <<http://goo.gl/u99X3q>>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- AKKOUH, O. *et al.* Lectins with Anti-HIV activity: a review. **Molecules**, [S.l.], v. 20, n. 1, p. 648-668, jan. 2015. Disponível em: <<http://goo.gl/977Ua7>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
- ALBERTI, K. G. ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet. Med.**, [S.l.], 15, n. 7, p. 539-593, jul. 1998. Disponível em: <<http://goo.gl/tUQEkW>>. Acesso em: 16 dez. 2014.
- ALFRADIQUE, M. E. *et al.* Internações por condições sensíveis à atenção primária: a construção da lista brasileira como ferramenta para medir o desempenho do sistema de saúde (Projeto ICSAP – Brasil). **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6, p. 1337-1349, 2009. Disponível: <<http://goo.gl/qE9gJ5>>. Acesso em: 6 out. 2014.
- ALGAEBASE. [S.l.], c2015. Disponível em: <<http://www.algaebase.org/>>. Acesso em: 6 jan. 2015.
- ANDRADE, R. L. *et al.* Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. **J. Struct. Biol.**, [S.l.], v. 145, p. 216-225, 2004. Disponível em: <<http://goo.gl/K8S4VY>>. Acesso em: 23 nov. 2014.
- ANTU, K. A. *et al.* *Symplocos cochinchinensis* attenuates streptozotocin-diabetes induced pathophysiological alterations of liver, kidney, pancreas and eye lens in rats. **Exp. Toxicol. Pathol.**, [S.l.], v. 66, n. 7, p. 281-291, sep. 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/rvDbAW>>. Acesso em: 14 jan. 2015.
- ARECES, A. **Biología de agarofitas del género *Bryothamnion kutzing***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidad de La Haban, Cuba, p. 30-64. 1995.

ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. [S.l.], v. 27, p. 5-10, jan. 2004. Disponível em: <<http://goo.gl/zgDiXM>>. Acesso em: 15 set. 2014.

_____. **Therapy for diabetes mellitus and relates disorders**. 5. ed. [Alexandria, VA], c2009. 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/BpvRZY>>. Acesso em: 15 set. 2014.

BAEKESKOV, S. *et al.* Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature**, [S.l.], v. 347, n. 6289, p. 151-156, sep. 1990. Disponível em: <<http://goo.gl/fott6Z>>. Acesso em: 2 out. 2014.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BELLÓ, A. Estresse oxidativo no coração adaptado. *In*: MARRONI, N. P. *et al.* **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Porto Alegre: Ulbra, 2002. p.49-61.

BENEVIDES, N.M.B. *et al.* Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten brazilian marine algae. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, [Campinas], v. 10, n. 1, p. 31-36, 1998. Disponível em: <<http://goo.gl/YyqmsS>>. Acesso em: 13 dez. 2014.

BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev.*, v. 56, p. 425-35, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Caracterização do estado da arte em Biotecnologia Marinha no Brasil**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010a. Disponível em: <<http://goo.gl/HdC9b6>>. Acesso em: 10 out. 2014.

_____. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Saúde Brasil 2009: uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010b. Disponível em: <<http://goo.gl/IQn1SU>>. Acesso em: 10 out. 2014.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, [S.l.], v. 414, p. 813-820, dec. 2001. Disponível em: <<http://goo.gl/6QIDXw>>. Acesso em: 30 set. 2014.

Rocha, B.A.M; Claudener S. Teixeira, José C. Silva-Filho, Raphael B. Nóbrega, Daniel B. Alencar, Kyria S. Nascimento, Valder N. Freire, Carmem J.S. Gottfried, Celso S. Nagano, Alexandre H. Sampaio, Silvana Saker-Sampaio, Benildo S. Cavada, Plínio Delatorre. Structural basis of ConM binding with resveratrol, an anti-inflammatory and antioxidant polyphenol. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 72, p.1136–1142. 2015

CALVETE, J. J. *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cell. Mol. Life Sci.**, [S.l.], v. 57, n. 2, p. 343–350, feb. 2000. Disponível em: <<http://goo.gl/xTusM6>>. Acesso em: 19 dez. 2014.

CAO, X. *et al.* Purification of lectin from larvae of the fly, *Musca domestica*, and in vitro anti-tumor activity in MCF-7 cells. **J. Insect. Sci.**, [S.l.], v. 10, n. 164, p. 1-13, 2010. Disponível em: <<http://goo.gl/cmSCRj>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

CAVADA, B. S. *et al.* Glucose-mannose-binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. **Horm. Metab. Res.**, [S.l.], v. 35, n. 2, p. 125-127, feb. 2003. Disponível em: <<http://goo.gl/hqgXbz>>. Acesso em: 5 jan. 2015.

CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr. Protein. Pept. Sci.**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 123-135, jun. 2001. Disponível em: <<http://goo.gl/38xVY5>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

CORDEIRO, R. A. *et al.* Effect of proteins from the red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the growth of human pathogen yeasts. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 49, n. 6, p. 915-921, nov. 2006. Disponível em: <<http://goo.gl/LUcD0t>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/r2wqUv>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

DA DELFINO, V. *et al.* Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. **J. Bras. Nefrol.**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002. Disponível em: Acesso em:

DOGRA, G. *et al.* Endothelium-dependent and independent vasodilation studied at normoglycaemia in Type I diabetes mellitus with and without microalbuminuria. **Diabetologia**, [S.l.], v. 44, n. 5, p. 593-601, 2001. Disponível em: <<http://goo.gl/YNdVs>>. Acesso em: 28 set. 2014.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharm. J.**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 1-25, jan. 2010. Disponível em: <<http://goo.gl/wg0333>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

ERLICH, H. *et al.* HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, [S.l.], v. 57, n. 4, p. 1084-1092, apr. 2008. Disponível: <<http://goo.gl/sUKH5R>>. Acesso em: 4 out. 2014.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan./mar. 1997. Disponível em: <<http://goo.gl/6spWDP>>. Acesso em: 29 out. 2014.

FUNCTIONAL ingredients from algae for foods and nutraceuticals. [S.l.]: Woodhead Publishing, 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/DXeMQG>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

GANESAN, P.; KUMAR, C. S.; BHASKAR, N. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 99, n. 8, p. 2717–2723, may 2008. Disponível em: <<http://goo.gl/rxU3EF>>. Acesso em: 14 dez. 2014.

GRAY, A. M; FLATT, P. R. Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). **J. Endocrinol.**, [S.l.], p. 160, n. 3, p. 409-414, 1999. Disponível em: <<http://goo.gl/fcxDRT>>. Acesso em: 13 nov. 2014.

GREEN, K; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, [S.l.], v. 53, (suplemento 1), p. 110-118, feb. 2004. Disponível em: <<http://goo.gl/tPhT8z>>. Acesso em: 23 out. 2014.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, [S.l.], v. 142, n. 2, p. 231-255, may 2004. Disponível em: <<http://goo.gl/nPNRxF>>. Acesso em: 20 out. 2014.

HERR, R. R.; JAHNKE, H. K.; ARGOUDELIS, A. D. The structure of streptozotocin. **J. Am. Chem. Soc.**, [S.l.], v.89, n. 18, p. 4808-4809, aug. 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/F87JN5>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

HISSA, N. M.; HISSA, A. S. R; BRUIN, V. M. S. Tratamento do Diabetes Mellitus tipo 1 com bomba de infusão subcutânea contínua de insulina e insulina lispro. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 487-493, oct. 2001. Disponível em: <<http://goo.gl/NN7cnu>>. Acesso em: 13 out. 2014.

HUVERS, F.C. *et al.* Endothelium-dependent vasodilatation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1 diabetes under near-normoglycemic conditions. **Diabetes**, [S.l.], v. 48, n. 6, p. 1300-1307, jun. 1999. Disponível em: <<http://goo.gl/FIDXFW>>. Acesso em: 25 set. 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes atlas update 2012: Regional & Country Factsheets. [S.l.], 2012. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetes-atlas-update-2012-regional-countryfactsheets>>. Acesso em: 16 nov. 2014.

KANG, C. *et al.* Brown alga *Ecklonia cava* attenuates type 1 diabetes by activating AMPK and Akt signaling pathways. **Food Chem. Toxicol.**, [S.l.], v. 48, n. 2, p. 509-516, feb. 2010. Disponível em: <<http://goo.gl/2gHv8T>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

KANG, K. A. *et al.* Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. **FEBS Lett.**, [S.l.], v. 579, n. 28, p. 6295–6304, nov. 2005a. Disponível em: <<http://goo.gl/PRWz7H>>. Acesso em: 5 jan. 2015.

KANG, K. A. *et al.* Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation. **J. Cell. Biochem.**, [S.l.], v. 97, n. 3, p. 609–620, feb. 2006. Disponível em: <<http://goo.gl/w8ITaA>>. Acesso em: 6 jan. 2015.

KANG, K. A. *et al.* Triphlorethol-A from *Ecklonia cava* protects V79-4 lung fibroblast against hydrogen peroxide induced cell damage. **Free Radic. Res.**, [S.l.], v. 39, n. 8, p. 883–892, aug. 2005b. Disponível em: <<http://goo.gl/OAmeck>>. Acesso em: 6 jan. 2015.

KIM, M. J.; KIM, H. K. Insulinotrophic and hypolipidemic effects of *Ecklonia cava* in streptozotocin-induced diabetic mice. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, [S.l.], v. 5, n. 5, p. 374–379, may 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/wSt3oD>>. Acesso em: 28 nov. 2014.

KIMURA, I. Medical benefits of using natural compounds and their derivatives having multiple pharmacological actions. **Yakugaku Zasshi**, [S.l.], v. 126, n. 3, p.133–143, mar. 2006. Disponível em: <<http://goo.gl/B5sT5d>>. Acesso em: 4 jan. 2015.

KONIG, G. M.; WHIGTH. A. D. Marine natural products research, current directions and future potential. **Planta Med.**, [S.l.], v. 62, n. 3, p.193-211, jun. 1996. Disponível em: <<http://goo.gl/xzEt2f>>. Acesso em: 22 nov. 2014.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 433-441, out./dez. 2003. Disponível em: <<http://goo.gl/8QJShr>>. Acesso em: 24 out. 2014.

LE DOUX, S. P. *et al.* Mecanismos de nicotinamide, thymidine protection from alloxan, streptozotocin toxicity. **Diabetes**, [S.l.], v.37, n. 8, p. 1015-1019, aug. 2008. Disponível em: <<http://goo.gl/FyDCvQ>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

LI, K. *et al.* Bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* with DPPH radical scavenging activity. **J. Nat. Prod.**, [S.l.], v. 71, n. 1, p. 28-30, dec. 2008. Disponível em: <<http://goo.gl/HaLRmQ>>. Acesso em: 14 dez. 2014.

LIMA, R. F. *et al.* Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **J. Pharm. Pharmacol.**, [S.l.], v. 56, n. 11, p. 1415-1421, nov. 2004. Disponível em: <<http://goo.gl/Okm6d3>>. Acesso em: 2 dez. 2014.

LOPES, F. C.; CAVADA, B. S.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; GOMES, J. C. Differential Effect of Plant Lectins on Mast Cells of Different Origins. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 6, p. 935-941, 2005.

LOPES, G. *et al.* Can phlorotannins purified extracts constitute a novel pharmacological alternative for microbial infections with associated inflammatory conditions? **PLoS ONE**, [S.l.], v. 7, n. 2, p. e31145, feb. 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/CtZklG>>. Acesso em: 21 nov. 2014.

MARCONDES, J. A. M. Diabete *Mellitus*: fisiopatologia e tratamento. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba.**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 18-36, 2003. Disponível em: <<http://goo.gl/44Cio9>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

MENDEZ, J. D.; RAMOS, H. G. Animal models in diabetes research. **Arch. Med. Res.**, [S.I.], v.25, n. 4, p. 367-375, 1994. Disponível em: <<http://goo.gl/bbNtJM>>. Acesso em: 2 dez. 2014.

MIZOGUCHI, T. *et al.* Nutrigenomic studies of effects of Chlorella on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. **J. Med. Food**, [S.I.], v. 11, n. 3, p. 395-404, sep. 2008. Disponível em: <<http://goo.gl/yzaczp>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

MOTA, M. R. L.; CRIDDLE, D. N.; ALENCAR, N. M. N.; GOMES, R. C.; MEIRELES, A. V. P.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C. A. A.; OLIVEIRA, C. C.; BENEVIDES, R. G.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, v. 374, n. 1, p. 1-10, 2006.

NEVES, S. A. *et al.* Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. **Inflamm Res.**, [S.I.], v.50, n. 10, p. 486-490, oct. 2001. Disponível em: <<http://goo.gl/HzaC6N>>. Acesso em: 28 nov. 2014.

NWOSU, F. *et al.* Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. **Food Chem.**, [S.I.], v. 126, n. 3, p. 1006–1012, jun. 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/tc17VX>>. Acesso em: 27 dez. 2014.

ONUNOGBO, C. *et al.* Chemical composition of mistletoe extract (*Loranthus micranthus*) and its effect on the protein, lipid metabolism and the antioxidant status of alloxan induced diabetic rats. **J. Med. Res.**, [S.I.], v. 1, n. 4, p. 057–063, may 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/l8sK6h>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia**: report of a WHO/IDF consultation. [Genebra], c2006. Disponível em: <<http://goo.gl/xNZEhS>>. Acesso em: 15 out. 2014.

_____. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**: report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Genebra, c1999. Disponível em: <<http://goo.gl/iZu3mU>>. Acesso em: 17 set. 2014.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, [S.I.], p. 70, n. 1, p. 158-169, jul. 1967. Disponível em: <<http://goo.gl/ShpiLH>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

PALMER, J. P. *et al.* Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. **Science**. [S.I.], v. 222, n. 4630, p. 1337-1339, dec. 1983. Disponível em: <<http://goo.gl/9xilGJ>>. Acesso em: 2 out. 2014.

PANGESTUTI, R.; KIM, S. Neuroprotective effects of marine algae. **Mar. Drugs**, [S.I.], v. 9, n. 5, p. 803–818, may 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/x6deMW>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

PASSOS, V. M. A. *et al.* Diabetes tipo 2: prevalência e fatores associados em uma comunidade brasileira. Projeto Bambuí de estudo de saúde e envelhecimento. **São Paulo Med. J.**, v. 123, n. 2, p. 66-71, 2005. Disponível em: <<http://goo.gl/uQ8nyi>>. Acesso em: 4 out. 2014.

PEREIRA, J. V. **Bioquímica clínica**. 2. ed. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2008.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant. Physiol.**, [S.l.], v.109, n. 2, p. 347-352, oct. 1995. Disponível em:<<http://goo.gl/oPjMaH>>. Acesso em: 5 nov. 2014.

PEREIRA-DA-SILVA, G.; MORENO, A. N.; MARQUES, F.; OLIVER, C.; JAMUR, M. C.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1760, p. 86-94, 2006.

PINTO, V. P. T.; TEIXEIRA, E. H.; TEIXEIRA, A. H.; CARNEIRO, V. A.; CRISTINO-FILHO, G.; DUS, D.; DEBRAY, H.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Lectins isolated from brazilian beans as markers of membrane glycoconjugates of human colon câncer cells. **J. Cancer Res. Exp. Oncol.**, v. 2, n. 5, p. 54-59, 2010.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARINI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37917). **Cancer Chemother. Rep.**, [S.l.], v.29, p. 91-98, may. 1963. Disponível em: <<http://goo.gl/NbU0vl>>. Acesso em: 10 out. 2014.

REIS, C. *et al.* Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 29, p. 359-392, mar. 2009. Disponível em: <<http://goo.gl/lh96OC>>. Acesso em: 7 jan. 2015.

RENGASAMY, K. R. R. *et al.* Advances in algal drug research with emphasis on enzyme inhibitors. **Biotec. Advances**, [S.l.], v. 32, n. 8, p. 1364–1381, dec. 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/KIHohz>>. Acesso em: 23 dez. 2014.

ROCHA, F. D. *et al.* Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, p. 17, n. 4, p. 631-639, oct./dec. 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/9v0sBR>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

ROGERS, D. J.; HORI, K. Marine algal lectins; new developments. **Hidrobiologia**, [Belgium], v. 260, p. 589-593, 1993. Disponível em: <<http://goo.gl/mo3Sa4>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

SANCHÉZ, P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. La melatonina en la reducción de estrés oxidativo. *In*: MARRONI, N. P. *et al.* **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Porto Alegre: Ulbra, 2002. p. 163-176.

SANTINI, S. A. *et al.* Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. **Diabetes**, [S.l.], v. 46, n. 11, p. 1853-1858, nov. 1997. Disponível em: <<http://goo.gl/2RDmCs>>. Acesso em: 11 out. 2014.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 308-313, jul./ago. 2004. Disponível em: <<http://goo.gl/VFVYvv>>. Acesso em: 29 out. 2014.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr./jun. 2004. Disponível em: <<http://goo.gl/KOdXAe>>. Acesso em: 15 out. 2014.

SILVA, M. *et al.* Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 55, n. 2, p. 46-53, feb. 2011. Disponível em: <<http://goo.gl/OACdtG>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**: 2013-2014. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/gTJwjG>>. Acesso em: 15 set. 2014.

SOUZA, C. F. *et al.* Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 56, n. 5, p. 275-284, 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/P2GbBK>>. Acesso em: 17 set. 2014.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, [S.l.], v. 42, n. 6, p. 1075-1108, dec. 2003. Disponível em: <<http://goo.gl/ErkFW1>>. Acesso em: 11 out. 2014.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; OLIVEIRA, T. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SOUZA, J. B.; HAVT, A.; PINTO, V. P. T.; GONÇALVES, R. B.; FARIAS, W. R. L.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. *Journal of Applied Microbiology.*, v. 103, p. 1001-1006, 2007.

THOMÁS, E. *et al.* Hyperglycemia and insulin resistance: possible mechanism. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, [S.l.], v. 967, p. 43-51, jun. 2002. Disponível em: <<http://goo.gl/nQJ4gR>>. Acesso em: 20 set. 2014.

TIAN, Y.; JOHNSON, G.; ASHCROFT, S. J. H. Sulfonylureas enhance exocytosis from pancreatic beta-cells by a mechanism that not involve direct activation of protein kinase C. **Diabetes**, [S.l.], v. 47, n. 11, p. 1722-1726, nov. 1998. Disponível em: <<http://goo.gl/F7GzRO>>. Acesso em: 13 dez. 2014.

TODD, J. A.; BELL, J. I.; McDEVITT H. O. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. **Nature**. [S.l.], v. 329, n. 6140, p. 599-604, oct. 1987. Disponível em: <<http://goo.gl/TSQNMMD>>. Acesso em: 2 out. 2014.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **BioMed Res. Intern.**,

[S.l.], v. 2014, p. 1-9, may. 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/2HYBAM>>. Acesso em: 22 dez. 2014.

VECINA, J. F. *et al.* Chlorella modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice. **Life Sci.**, [S.l.], v. 95, n. 1, p. 45–52, jan. 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/gWO8Te>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

VELAYUTHAM, R.; SANKARADOSS, N.; AHAMED, K. F. Protective effect of tannins from *Ficus racemosa* in hypercholesterolemia and diabetes induced vascular tissue damage in rats. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, [S.l.], v. 5, n. 5, p. 367-373, may, 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/TJfJqR>>. Acesso em: 16 dez. 2014.

VIANA, G.S.B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz and *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 6, p. 713-722, jun. 2002. Disponível em: <<http://goo.gl/HZLLDT>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

VIDAL, A. *et al.* Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 589-600, oct./dec. 2006. Disponível em: <<http://goo.gl/IEKkMy>>. Acesso em: 23 nov. 2014.

VIEIRA, L.A.P. *et al.* The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 7, p.1071-1079, jul. 2004. Disponível em: <<http://goo.gl/bQkyK6>>. Acesso em: 25 out. 2014.

YOON, N. Y. *et al.* Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. **Fisheries Sci.**, [S.l.], v. 74, n. 1, p. 200–207, feb. 2008. Acesso em: <<http://goo.gl/THJgSl>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

ZUBIA, M. *et al.* Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chem.**, [S.l.], v. 116, n. 3, p. 693–701, oct. 2009a. Disponível em: <<http://goo.gl/4eAJ7t>>. Acesso em: 18 dez. 2014.

ZUBIA, M. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). **Botanica Marina**, [S.l.], v. 52, n. 3, p. 268–277, jun. 2009b. Disponível em: <<http://goo.gl/X6g6Kw>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

ZUBIA, M.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, México. **J. Appl. Phycol.**, [S.l.], v. 19, p. 449-458, 2007. Disponível em: <<http://goo.gl/hDcx2Z>>. Acesso em: 10 out. 2014.

