



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

JOÃO BOSCO DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
GASTROPROTETORA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA
MARINHA VERMELHA *Gracilaria cearensis***

FORTALEZA

2018

JOÃO BOSCO DE CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
GASTROPROTETORA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Gracilaria cearensis*

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

FORTALEZA

2018

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)

C324c Carvalho, João Bosco de.
Caracterização Química, Atividade Antioxidante e Gastroprotetora de Polissacarídeos Sulfatados da Alga Marinha Vermelha Gracilaria Cearensis / João Bosco de Carvalho. – 2018.
50 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. Gracilaria Cearensis. 2. Atividade Gastroprotetora . 3. Carboidratos sulfatados . I. Título.

CDD 572

JOÃO BOSCO DE CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
GASTROPROTETORA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Gracilaria cearensis*

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

Aprovada em 20/07/18

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Vânia Marilande Ceccato
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter direcionado meus caminhos para os estudos e por ter conhecido o departamento de bioquímica da UFC.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Lúcia Ponte Freitas por ter me aceitado e acolhido no laboratório de algas marinhas (Labalgas) da melhor maneira possível, tornando o ambiente calmo, aconchegante e ideal para realização de estudos e pesquisas.

À minha mãe, Maria Francisca de Carvalho e a minha noiva, Mikelle Viviane Ribeiro de Sousa, por todo o apoio e carinho ao longo desses anos de mestrado.

Aos professores Dr. André Luis Coelho da Silva, Dra. Vânia Marilande Ceccato e Dra. Norma Maria Barros Benevides por gentilmente aceitar integrar a banca examinadora deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório: Willer Malta, Glauber Cruz, Clark Barros, Lindauro Jr., Poliana Cavalcante, Diego chagas, Thais, Agnes, Vanessa e Valesca.

Ao Laboratório de química de Polímeros da UFC por ter disponibilizado os equipamentos e as análises de infravermelho e GPC.

À Lorena Mara Alexandre e Silva e Guilherme Julião Zocolo da Embrapa pela disponibilização dos equipamentos e as análises de RMN- C_{13} e RMN- H_1 e HSQC.

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

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

As algas marinhas vermelhas do gênero *Gracilaria* apresentam em sua composição química polissacarídeos sulfatados e são bastante utilizadas na área alimentícia como emulsificantes estabilizantes, na área industrial como base para shampoos e cosméticos. Recentemente na área farmacêutica os polissacarídeos de algas marinhas vêm sendo estudados devido suas atividade biológicas, apresentando atividades antioxidantes, gastroprotetoras, antivirais, dentre outras. O objetivo deste trabalho foi coletar, extrair, caracterizar e avaliar o potencial antioxidante e gastroprotetor de polissacarídeos sulfatados obtidos da alga vermelha *Gracilaria cearensis* (PSGC). Os polissacarídios sulfatados foram obtidos a partir da extração enzimática com papaína de amostras secas e maceradas da alga vermelha *Gracilaria cearensis*. A quantidade de carboidratos totais e resíduos de proteínas foi avaliada através de testes colorimétricos. Foi observado rendimento na extração de 17,32%, caracterizando um bom rendimento em comparação com outras algas do gênero *Gracilaria*. A quantidade de proteínas na amostra foi irrelevante, demonstrando a eficácia na extração. A caracterização química foi realizada a partir de testes de espectroscopia de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de carbono e de hidrogênio (RMN-C₁₃, RMN-H₁) e coerência quântica heteronuclear única (HSQC). A massa molar média foi determinada por cromatografia por permeação em gel (GPC). O PSGC demonstrou ser uma agarana do tipo furonana com um peso molecular de 246,34 KDa. Foram realizados testes de gastroproteção por ingestão oral de álcool etílico em camundongos fêmeas swiss observando a ação do PSGC. Foram observados índices de proteção gástrica frente ao etanol em torno de 60 a 80%, resultando em uma proteção máxima de 82,4% em concentrações de 10 mg/mL do PSGC. Foram realizados testes antioxidantes (atividade antioxidante por quelação do íon ferroso, por formação do complexo fosfomolibdênio e por sequestro do radical difenil-picrilhidrazil-DPPH) com objetivo de entender o mecanismo de proteção gástrica. Foram observados 78% de atividade antioxidante de quelação do íon ferroso, possivelmente indicando que a ação gastroprotetora dos polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria cearensis* (PSGC) está relacionado com a quelação de grupos hidroxilas das moléculas de espécies reativas de oxigênio (ROS). Dessa forma o PSGC pode ser considerado uma biomolécula antioxidante e apresentando ação gastroprotetora, podendo futuramente ser empregado como possível fármaco auxiliar em tratamentos gastroprotetores .

Palavras-chave: *Gracilaria cearensis*. Atividade gastroprotetora. Carboidratos sulfatados.

ABSTRACT

The red seaweed of the genus *Gracilaria* have in their chemical composition sulphated polysaccharides and are widely used in the food area as stabilizing and emulsifiers. In the industrial area as a base for shampoos and cosmetics. Recently in the pharmaceutical area the polysaccharides of marine algae have been studied due to their biological activities, presenting antioxidant, gastroprotective, antiviral activities, among others. The objective of this work was to collect, extract, characterize and evaluate the antioxidant and gastroprotective potential of a sulphated polysaccharides obtained from the red algae *Gracilaria cearensis* (PSGC). The sulphated polysaccharides was obtained from enzymatic extraction with papain from dried and macerated samples of the red algae *Gracilaria cearensis*. The amount of total carbohydrates and protein residues were evaluated by colorimetric tests. It was observed yield in the extraction of 17.32%, characterizing a good yield in comparison with other algae of the genus *Gracilaria*. The amount of protein in the sample was irrelevant, demonstrating the efficiency in the extraction. The chemical characterization was performed using infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance of carbon and hydrogen (MNR-C₁₃, MNR-H₁) and single heteronuclear quantum coherence (HSQC) tests. The average molar mass was determined by gel permeation chromatography (GPC). The PSGC was shown to be a furanan type agarane having a molecular weight of 246.34 KDa. Gastroprotection tests were performed by oral ingestion of ethyl alcohol in swiss female observing the action of PSGC. Gastric protection rates were observed around 60 to 80% against ethanol, resulting in a maximum protection of 82.4% in concentrations of 10 mg/mL of the PSGC. Antioxidant tests were performed (antioxidant activity by ferrous ion chelation, formation of the phosphomolybdenum complex and sequestration of the diphenyl-picrylhydrazyl-DPPH radical) in order to understand the mechanism of gastric protection. About 78% of the antioxidant activity of ferrous ion chelation was observed, possibly indicating that the gastroprotective action of *Gracilaria cearensis* polysaccharide (PSGC) is related to the chelation of hydroxyl groups of the reactive oxygen species (ROS) molecules. Thus, PSGC can be considered an antioxidant biomolecule and presents an gastroprotective action, and may be used as a possible auxiliary drug in gastroprotective treatments in the future.

Keywords: *Gracilaria cearensis*. Gastroprotective action. Sulfated carbohydrates.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química das galactanas (carragenanas e agaranas).....	17
Figura 2 – Redução do DPPH pela ação antioxidante do analito (AH).....	22
Figura 3 – Quelação do íon Fe ²⁺ pela ferrozina.....	23
Figura 4 – Excicata de algas marinhas vermelhas Gracilarias Cearensis.....	27
Figura 5 – Esquema de extração enzimática PSGC.....	28
Figura 6 – A – Estrutura de uma Galactana; 6 B – Estrutura do PSGC: Agarose furonamo α -1-3-(6-O-Me) – 5 Me -D – galactose acetal.....	41
Figura 7 – Estômago de camundongos no teste de Gastroproteção.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de algas marinhas vermelhas, seus respectivos polissacarídeos e aplicações farmacológicas.....	20
Tabela 2 - Rendimento de espécies de algas vermelhas.....	34
Tabela 3 - Porcentagem de carboidrato total de algas vermelhas.....	35
Tabela 4 - Microanálise elementar do PSGC.....	36
Tabela 5 - Deslocamentos químicos de RMN 1H e 13C para PSGC.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cromatografia de Permeação em gel da amostra PSGC.....	36
Gráfico 2 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do PSG.....	37
Gráfico 3 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho de algas vermelhas.....	38
Gráfico 4 - Espectro de RMN-H1 PSGC.....	39
Gráfico 5 - Espectro de RMN-C13 PSGC.....	40
Gráfico 6 - HSQC do PSGC.....	41
Gráfico 7 - Concentração da Atividade antioxidante (DPPH) do PSGC.....	43
Gráfico 8 - Atividade antioxidante (Quelação do íon ferroso) do PSGC.....	44
Gráfico 9 – antioxidante (formação do complexo fosfomolibdênio).....	45
Gráfico 10- Atividade Gastroprotetora do PSGC.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA	Butilado de hidroxianisol
BHT	Butilado de hidroxitolueno
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
PSGC	Polissacarídeos sulfatados da <i>Gracilaria cearenses</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN-H ₁	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN-C ₁₃	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
HSQC	Corência quântica heteronuclear única
IPB	Inibidor de bomba de prótons
BSA	Albumina sérica bovina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Algas.....	15
1.2	Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas	16
1.3	Galactanas	16
1.4	Aplicações e potencialidades comerciais.....	17
1.5	Gracilarias.....	19
1.6	Propriedades farmacológicas de polissacarídeos de algas	19
1.7	Atividade antioxidante	21
1.8	Testes antioxidantes.....	21
1.8.1	<i>Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)</i>	21
1.8.2	<i>Capacidade antioxidante Total</i>	22
1.9	Lesões gástricas induzidas por etanol.....	23
1.10	Medicamentos utilizados no tratamento de inflamações gástricas	24
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral.....	25
2.2	Objetivos específicos.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Coleta e identificação da alga marinha.....	26
3.2	Uso de animais (camundongos swiss fêmea)	27
3.3	Extração enzimática dos polissacarídeos sulfatados totais	27
3.3.1	<i>Rendimento da extração</i>	28
3.4	Caracterização química	29
3.4.1	<i>Determinação de carboidratos totais.....</i>	29
3.4.2	<i>Determinação de proteínas.....</i>	29
3.4.3	<i>Determinação de carbono e sulfato</i>	30
3.5	Caracterização química estrutural	30
3.5.1	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC).....</i>	30
3.5.2	<i>Espectroscopia na região do infravermelho</i>	31
3.5.3	<i>Ressonância Magnética nuclear</i>	31
3.6	Atividade antioxidante	31
3.6.1	<i>Capacidade antioxidante total.....</i>	31

3.6.2	<i>Quelação do íon ferroso</i>	32
3.6.3	<i>Sequestro do Radical</i>	32
3.7	<i>Atividade farmacológica</i>	33
3.7.1	<i>Modelo de inflamação gástrica induzida por etanol em camundongos</i>	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
4.1	Rendimento da extração	34
4.2	Determinação de proteínas	35
4.3	Determinação de carbono e sulfatos	35
4.4	Cromatografia de permeação em gel (GCP)	36
4.5	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	37
4.6	Espectro de ressonância magnética nuclear	38
4.7	Espectroscopia de coerência quântica heteronuclear única (HSQC)	40
4.8	Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DDPH)	42
4.9	Quelação do íon ferroso	43
4.10	Capacidade antioxidante total pela formação do complexo fosfomolibdênio	44
4.11	Atividade do PSGC no modelo de Gastroproteção	45
5	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas

Algas são organismos aquáticos que apresentam ampla utilização em diversos setores econômicos e ambientais, devido sua alta diversidade, propriedades químicas e aplicações farmacológicas distintas. As algas podem servir tanto como um indicador natural de poluentes quanto como purificadores ambientais ao serem utilizadas para remover compostos químicos em ambientes aquáticos poluídos, tendo assim ótima utilização ambiental. (TRAINOR, 1983).

As algas são utilizadas pelo homem à muitos anos, inicialmente na alimentação, por possuírem características alimentares apropriadas para consumo humano, posteriormente, como emulsificante na área industrial. O ágar é um polissacarídeo sulfatado (galactana) obtido á partir de extratos de algas vermelhas marinhas. O ágar é composto por unidades de agarose e de agarpectina. A agarose é um polissacarídeo neutro, cuja estrutura apresenta unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose 1-3- β -D-galactose e 1-4-3,6-anidro- α -L-galactose. Já a agarpectina caracteriza-se como um polissacarídeo ácido contendo sulfato, metil, ácido pirúvico adicionado à agarobiose (DUCKWORTH, M.; YAMPLE, W. 1971).

O ágar é um hidrocolóide gelatinoso muito usado na indústria como emulsificante, estabilizante, utilizado para controle de textura na fabricação de queijos, hambúrgueres e sobremesas geladas como pudins e sorvetes. Na microbiologia é usado como meio de cultura de bactérias. (STANLEY, 1987).

Na utilização industrial e alimentar as algas atualmente vem sendo estudadas devido suas propriedades bioquímicas ações farmacológicas. Extratos de algas como carboidratos e proteínas podem apresentar ações gastroprotetoras, antioxidantes bem como anti-inflamatórias, podendo participar como fármacos auxiliares ou principais, daí a importância de estudá-las. (BOHN; MILLER, 1995).

Desde 1969, quando R.H. Wittaker propôs um sistema de classificação das espécies em cinco reinos, podemos classificar as algas em três, as algas azuis ou cianobactérias como monera (procariontes, unicelulares e autótrofos), algas protistas (unicelulares e apresentam pigmentos que realizam a fotossíntese) e algas do reino plantae (pluricelulares, eucariontes e autótrofos). Dentre as famílias de algas encontram-se as Rhodophytas (algas vermelhas) que possuem pigmentos vermelhos ficobilinas. Encontram-se fixadas em substratos ou flutuando

em ambientes quase que exclusivamente em ambientes marinhos e apresentam cerca de 7000 espécies reconhecidas atualmente. Na família das Rhodophytas encontram-se algas dos gêneros *Gelidium*, *Pterocladia*, *Gelidiella* and *Gracilaria*, as quais constituem a matéria prima para obtenção de Ágar. (STANLEY, 1987).

1.2 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

Polissacarídeos são carboidratos cuja estrutura consiste em monômeros (monossacarídeos) polimerizados, apresentando altos pesos moleculares. Polissacarídeos diferenciam-se pelo tamanho da cadeia, pelas ligações intermoleculares e pelas subunidades monoméricas. Não apresentam peso molecular específico, podendo apresentar um mesmo polissacarídeo com quantidades diferentes de resíduos (monómeros), pois são sintetizadas por enzimas. (VESILEK. J; CEJPEK. K, 2005)

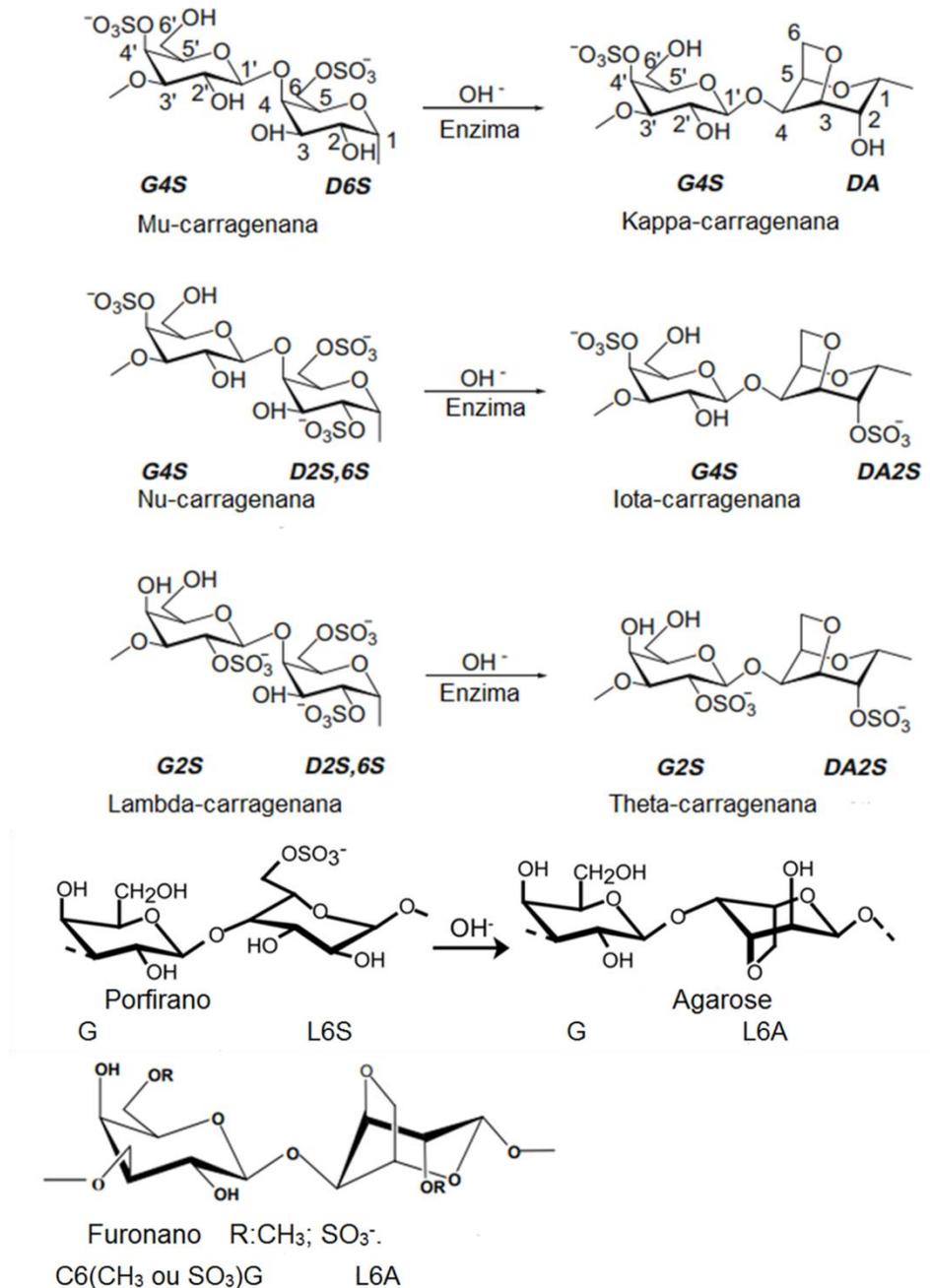
Carboidratos desempenham principalmente funções energéticas nos organismos vivos, podendo atuar como material energético primário (glicose) ou como reserva metabólica energética (amido e glicogênio, para células vegetais e animais, respectivamente), entretanto também podem desempenhar funções estruturais, como a quitina, que participa da constituição do exoesqueleto dos artrópodes e na parede celular de alguns fungos. Alguns glicosaminoglicanos (dissacarídios formados por uma hexosamina ligada a um monossacarídeo não nitrogenado) possuem grupos sulfatos, que se liga a proteínas na formação de proteoglicanos, desempenhando função estrutural e regulatória celular.

1.3 Galactanas

Os polissacarídeos sulfatados presentes nas algas vermelhas são estruturas químicas chamadas de galactanas. As galactanas são polímeros constituídos por dissacarídeos de cadeias lineares alternadas de α -1-3-D-galactopiranosil (subunidade A) e β 1-4 D ou L-galactopiranosil (subunidade B). (Knutsen *et al.* 1994). As galactanas podem ser classificadas como: Carragenanas ou agaranas (agaróides).

As carragenanas apresentam subunidade A composta por de α -1-3-D-galactopiranosil e a subunidade B correspondente à β -1-4-3,6-D-galactose. As agaranas apresentam subunidade A composta por de α -1-3-D-galactopiranosil e a subunidade B composta por β -1-4-3,6-L-galactose (na configuração L).

Figura 1- Estrutura química das galactanas (carragenanas e agaranas)



Fonte: MINORSKY, P. V. Vol. 151, p.1610, 2009.

1.4 Aplicações e potencialidades comerciais

O consumo de algas na alimentação teve início na Ásia no começo de século IV, mais precisamente no território da China, Coreia e do Japão. Devido Japão estar cercado de mares (mar oeste da china, mar de Okhotsk e mar do Japão) e o oceano pacífico e seu território ser formado principalmente por montanhas, a principal fonte de alimentação do país sempre foi a pesca e o consumo algas. No Japão existem cerca de 200 espécies de algas verdes, 270 espécies

de algas marrons e cerca de 670 espécies de algas vermelhas (MURATA, 2001).

Desde a década de 90 a indústria utiliza-se de uma ampla gama de produtos provenientes de algas marinhas, sendo bastante usados como estabilizantes e emulsificantes na área alimentícia, alcançando valores entre 5,5 a 6 bilhões de dólares por ano. As grandes maiorias dos lucros provem da extração de hidrocolóides, como o ágar. A indústria faz uso de grandes quantidades de algas secas, chegando a utilizar cerca de 8 milhões de toneladas por ano, abrangendo desde algas colhidas naturalmente quanto à algas cultivadas em fazendas particulares. (MCHUGH, 2003)

Atualmente diversos países utilizam as algas exportadas como fonte de economia. Estima-se que no ano de 2009 foram comercializados cerca de 110 mil toneladas de hidrocolóides, movimentando cerca de 318 milhões de dólares. Em 2010 o custo da tonelada de alga seca destinada à alimentação animal estava custando 160 dólares, demonstrando que as algas podem vir a ser uma fonte de alimentação animal viável em médio prazo, pois quanto mais as algas forem comercializadas menores serão os preços no mercado. (SANDER *et al.*, 2016)

Os principais exportadores da União Europeia entre os anos de 2010 a 2012 foram a Irlanda, França e os Países Baixos, sendo a China e o Japão os maiores exportadores mundiais. Os principais importadores foram os Estados Unidos da América, Austrália e a África do Sul. (VIGANI *et al.*, 2015)

No Brasil não há grandes movimentações financeiras com a exportação de algas marinhas, nem mesmo de seus subprodutos e biomoléculas, pois o país tem o seu foco no agropecuária e industrialização básica, apresentando uma falta de interesse nesse setor, entretanto esse cenário está começando a mudar e novas pesquisas na área estão começando a surgir, buscando aplicações farmacológicas para os extratos de algas, buscando observar efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antivirais, gastroprotetores, dentre outros. (VIDOTTI, ROLLENBERG, 2004)

Além da utilização industrial alimentícia, de cosméticos e farmacológica as algas vem cada vez mais sendo estudadas nas áreas de pesquisa e desenvolvimento, engenharia genética e biotecnologia de novos produtos, visando a obtenção de novas biomoléculas que apresentem atividades biológicas, gerando cada vez mais valor agregado à mercadoria. (ENZING *et al.*, 2014)

1.5 Gracilarias

O gênero de algas vermelhas *Gracilaria* constitui um grupo de algas marinhas que são encontrado em faixas de clima tropical e temperado, sendo que a maioria das espécies encontra-se em climas tropicais. (OLIVEIRA, 1984).

São organismos de vida livre. Apresentam Talo ereto ou reclinado, fixo por talo rígido do qual surgem eixos. São organismos dioicos, podendo apresentar fases mistas. Ramo carpogônios de células duplas. Apresentam células nutritivas tubulares conectando os gonimoblastos (filamentos esporo gênios nascidos no carpogônio fecundado) com o assoalho cistocárpico (formando um envelope protetor) em várias espécies. Além disso, conceptáculos espermatangiais com muitas cavidades foram considerados por alguns autores apenas como modificação do espermatangial do tipo verrucosa. (BIRD *et al.*, 1984).

Nas espécies de *Gracilarias*, células gametofíticas adicionais são posteriormente incorporadas por fusão em uma célula ramificada através de fusões de células nutritivas tubulares multinucleadas. Fundindo-se sobre as células no assoalho do cistocarpo e frequentemente sobre as células do pericarpo. (FREDERICQ & HOMMERSAND, 1990)

No gênero *Gracilaria* encontram-se diversas espécies que são responsáveis pela maior produção de agaranas (carboidratos sulfados) do mundo, amplamente utilizados como espessantes e emulsificantes na indústria alimentícia, e atualmente bastante estudados devido suas propriedades bioquímicas e farmacológicas. (BELLORIN *et al.*, 2009).

Sabendo que a maior parte das *Gracilarias* encontra-se em costas marinhas de clima tropical, é bastante comum encontra-las ao longo da costa brasileira, sendo assim de fácil obtenção para pesquisa. Dessa maneira espécies de algas vermelhas do gênero *Gracilaria* podem ser encontradas em algumas regiões da costa cearense, como praias do litoral leste (Flexeiras, 140 km de Fortaleza) e barra do Ceará.

1.6 Propriedades farmacológicas de polissacarídeos de algas

As algas recentemente vêm sendo estudadas devido sua alta variedade de compostos químicos bioativos, observando as potencialidades desses compostos como possíveis novos fármacos. Dentre as estruturas observadas estão os compostos halogêneos (terpenos, peptídeos, hidrocarbonetos, etc), proteínas e polissacarídeos sulfatados. (CABRITA *et al.*, 2010).

Os polissacarídeos sulfatados são macromoléculas, de peso molecular elevado, que interagem quimicamente com estruturas proteicas, devido à alta quantidade de cargas

negativas presentes em suas estruturas (hidroxilas e grupos sulfatos). Os polissacarídeos sulfatados de algas apresentam funções bioativas como antioxidantes e gastroprotetores da mucosa estomacal, inibindo a formação de radicais livres.

Os polissacarídeos sulfatados de algas são úteis como excipientes de comprimidos devido à alta robustez e viscoelasticidade persistente do comprimido durante a compressão. Podendo ser utilizadas para revestimento de fármacos para formulações de liberação prolongada (BHARDWAJ *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Espécies de algas marinhas vermelhas, seus respectivos polissacarídeos e aplicações farmacológicas.

Espécie	Tipo de Polissacarídeo	Aplicação farmacológica	Autor
<i>Cryptopleura ramosa</i>	Agarana	Antiviral	Carlucci <i>et al.</i> , 1997
<i>Porphyra yezoensis</i>	Porfirano	Antitumoral, imunomodulador, Hipolipidémico.	Kwon <i>et al.</i> , 2006 Yoshizawa <i>et al.</i> , 1993 Tsuge <i>et al.</i> , 2004
<i>Pterocladia capilácea</i>	S-agaranas Galactanas híbridas DL	Antiviral	Pujoe <i>et al.</i> , 1996
<i>Chondrus crispus</i>	λ -carrageenana	Antiviral, anticoagulante e antitrombótico.	Prajapati <i>et al.</i> , 2014 Luescher-Mattli, 2003
<i>Gigartina acicularis</i>	S-galactanas	Antioxidante	Costa <i>et al.</i> , 2010
<i>Gigartina skottsbergii</i>	S-carrageenanas	Antiviral, anticoagulante	Carlucci <i>et al.</i> , 1999

Fonte: RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015.

1.7 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias capazes sofrerem oxidação ao invés de outras substâncias, promovendo proteção frente à danos celulares e teciduais causados por espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila (OH), óxido nítrico (NO) e radical peroxil (ROO). (LIM *et al.*, 2002). O estresse oxidativo induzido pelos radicais livres constitui a causa de cerca de 200 doenças causadas no ser humano.

Os radicais livres são moléculas altamente reativas e produzidas durante vários processos celulares. Muitos das espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) estão agrupados como radicais livres, dentre eles ânions superóxidos (O₂⁻), radical hidroxila (OH⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO). EROs e ERNs podem ser produzidos por fontes endógenas (inflamação, câncer) e por fontes exógenas (poluentes, drogas e radiações). Sob condições normais, as EROs participam de muitas funções fisiológicas como proteger o organismo contra patógenos invasores, participam da transdução de sinal do receptor de citosina-tirosina, dentre outras. (SALIM, 2014).

Embora sejam indispensáveis para várias reações metabólicas as espécies reativas podem iniciar muitas doenças caso estejam acumuladas nas células. Várias alterações degenerativas nas células e nos tecidos podem ocorrer devido ao estresse oxidativo, danificando ácidos nucléicos, lipídios e proteínas, podendo causar danos irreversíveis ao organismo, causando apoptose ou necrose celular. Doenças autoimunes, neurodegenerativas e câncer também podem ser causados pelo stress oxidativo. (NDHLALA *et al.*, 2010)

Compostos antioxidantes podem proteger os danos oxidativos e prevenir o aparecimento de muitas doenças e compostos. Dentre os compostos extraídos de algas, os polissacarídeos sulfatados apresentam características de bons antioxidantes, podendo ser estudados para reduzir os danos causados por espécies reativas.

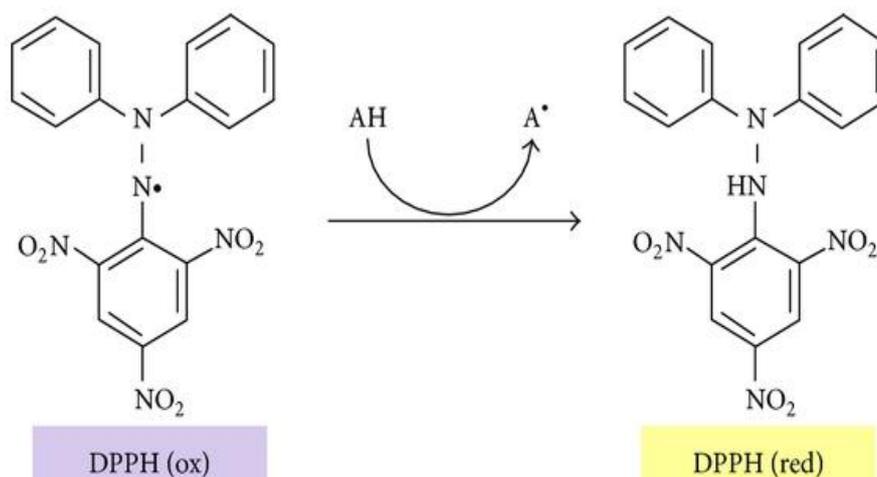
1.8 Testes antioxidantes

1.8.1 Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante foi determinada através do sequestro do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). O teste de DPPH mede a capacidade de um agente antioxidante (AH) reduzir o radical químico DPPH por transferência de um hidrogênio. O radical DPPH apresenta coloração violeta e após redução é transformado em DPPH-H que apresenta coloração amarelo. (figura 2) (TEIXEIRA *et al.*, 2013). Devido às propriedades químicas do

PSGC, a solução de DPPH terá variação na coloração final, e esta variação colorimétrica indica a capacidade do analito em atuar como uma espécie antioxidante.

Figura 2- Redução do DPPH pela ação antioxidante do analito (AH).



Fonte: YAMAGUCHI *et al.*, 1998.

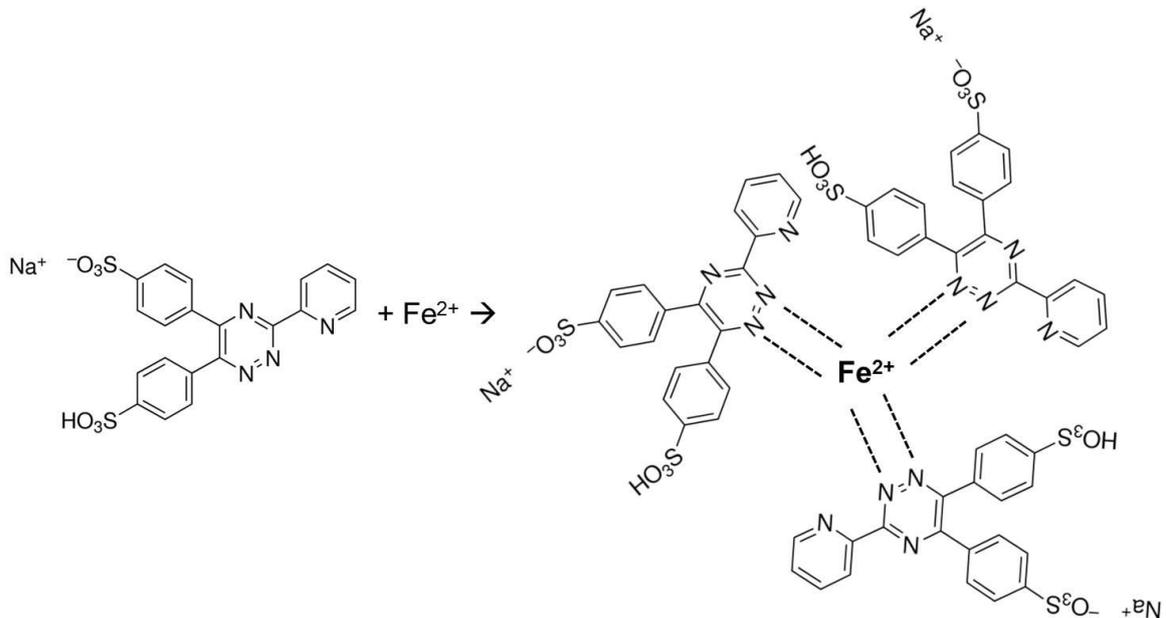
1.8.2 Capacidade antioxidante Total

O teste de capacidade antioxidante total baseia-se na redução do íon do metal molibdênio Mo^{6+} para Mo^{5+} pelo PSGC e formação de compostos específicos de fosfato de coloração verde. A absorção da solução foi medida em 695 nm e a curva padrão foi construída utilizando soluções de ácido ascórbico. (MOHAN, 2013)

1.8.3 Quelação do íon ferroso

No teste de quelação do íon ferroso (Fe^{2+}), a ferrozina (Sal monossódico do Ácido 3-2-Piridil-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-disulfônico) que é, um agente cromogênico, torna a solução final rósea em função da quantidade de ferro presente. Dessa maneira, quanto mais quelante for à amostra, menos ferro terá dissolvido na solução final e menor a absorbância, pois poucos íons ferro 2^+ irão complexar com a ferrozina. Como mostra na figura 3 abaixo.

Figura 3 - Quelação do íon Fe^{2+} pela ferrozina



Fonte: Elaborado pelo Autor.

1.9 Lesões gástricas induzidas por etanol

O sistema digestório consiste em um tubo muscular com epitélio que compreende a cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, ânus e órgãos anexos (glândulas salivares, fígado e pâncreas) que secretando compostos químicos que auxiliam no processo digestivo. Todo o processo digestivo é controlado pelo sistema nervoso e hormonal. (GUYTON; HALL, 1997).

A estrutura do estômago pode ser dividida em serosa, a camada muscular longitudinal, a camada muscular circular, a submucosa e a mucosa. A serosa reveste a maior parte do órgão, exceto a região cárdia. A submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e contém uma rica rede vascular e um plexo nervoso. A mucosa é a camada interna do estômago e abriga as glândulas gástricas (DANGELO; FATTINI, 2007).

No estômago encontram-se glândulas oxíticas e pilóricas. As glândulas oxíticas são compostas por células mucosas (secretam muco), células peptídicas (secretam enzimas

proteolíticas), células parietais (secretam ácido clorídrico, HCl) dentre outras. Já as glândulas pilóricas apresentam células mucosas, células G (liberam gastrina, hormônio que auxilia a secreção do ácido clorídrico). (RANG *et al.*, 2004).

O estômago é recoberto por uma camada de muco de aproximadamente 1 mm secretada por células mucosas que secretam muco alcalino, formando uma barreira física de proteção contra as secreções ácidas (secretadas pelas células parietais), além de contribuir para a lubrificação do transporte do alimento (SCHUBERT, 2005). Substâncias como o óxido nítrico (NO) e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione reduzida (GSH) também estão relacionadas com a manutenção da integridade gástrica.

As lesões gástricas ocorrem quando a mucosa estomacal diminuiu a capacidade de autoproteção, reduzindo a produção de secreções de muco. Com o aumento da acidez do meio, inicia-se a lesão da mucosa e da submucosa. O aumento da acidez pode causar lesões nos vasos sanguíneos e gerar contrações musculares involuntárias. Outro fator envolvido na lesão gástrica é o refluxo duodenal que degrada a mucosa e formando radicais livres que levam a lesão oxidativa e rompimento microvascular. (MURRAY, 1997).

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio, radicais livres e citosinas inflamatórias no estômago pode gerar estresse oxidativo, o qual dificulta a recuperação celular das mucosas. A utilização de fármacos anti-histamínicos e inibidores de bomba de prótons em tratamentos para gastroproteção também podem aumentar a permeabilidade da mucosa e permitindo a retrodifusão de H^+ , aumentando a acidose tecidual (KUPFER *et al.*, 2000).

1.10 Medicamentos utilizados no tratamento de inflamações gástricas

O tratamento de lesões gástricas baseia-se nas alterações da secreção do ácido gástrico e da enzima pepsina. Por volta da década de 70, iniciou-se a pesquisa dos antagonistas de receptores H₂ (anti-histamínicos) e foram bastante prescritos no mundo todo até o começo dos anos 90 (JAUREGUI, 1999). Existem dezenas de anti-histamínicos receitados, entretanto dentre eles destacam-se quatro, bastante utilizados clinicamente: famotidina, cimetidina, nizatidina e ranitidina. (McRORIE *et al.*, 2014)

Atuam na redução da secreção ácida, pois são antagonistas competitivos com a histamina pela sua ligação aos receptores H₂ nas células parietais, reduzindo os níveis de pepsina. O hormônio gastrina (regula a secreção ácida gástrica), ativa a liberação

de histamina pelos mastócitos da submucosa.

Os anti-histamínicos quando administrados para pacientes com problemas gástricos reduzem a secreção gástrica produzida no estômago após ingestão de alimentos, reduzindo o dano causado na mucosa gástrica dos mesmos, proporcionando um meio menos ácido, permitindo a recuperação de úlceras e outros danos gástricos. Entretanto, foram substituídos pelos inibidores de bomba de prótons (IBP), por apresentarem menos efeitos colaterais. Os anti-histamínicos por bloquearem os receptores de histamina, podem causar redução nos batimentos cardíacos (bradicardia), hipotensão, ansiedade e em alguns casos ginecomastia em homens. Os IBP atuam inibindo irreversivelmente a bomba de prótons (H^+/K^+ ATPase), na membrana das células parietais gástricas. A diminuição da proteína H^+/K^+ ATPase diminui a concentração de íon hidrogênio H^+ no lúmen gástrico, aumentando o pH. (BRAGA, 2011).

Os IBPs mais utilizados atualmente são o omeprazol, pantoprazol, lansoprazol e são fármacos extremamente eficazes na inibição da secreção do ácido gástrico. Entretanto, anti-histamínicos e os IBPs apresentam efeitos adversos quando utilizados em tratamentos de doenças crônicas. Dentre esses efeitos, destacam-se o desenvolvimento da hipergastrinemia (distúrbio endócrino causado pelo aumento da gastrina, fazendo que o estômago produza ácido gástrico em excesso), o aumento do risco de infecção bacteriana (como campylobacter, salmonela e clostridium), e a formação de câncer (YUAN *et al.*, 2006).

Sabendo dos riscos causados pela utilização à longo prazo desses fármacos se faz necessário estudar novas drogas que apresentem menos efeitos colaterais para pacientes de lesões gástricas crônicas, promovendo assim um tratamento menos agressivo ao paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a estrutura química, atividade antioxidante e gastroprotetora de polissacarídeos sulfatados obtidos a partir da alga vermelha *Gracilaria cearensis* (PSGC).

2.2 Objetivos específicos

- Extrair polissacarídeos sulfatados da alga *Gracilaria cearensis* (PSGC) através da

digestão enzimática com papaína.

- Determinar rendimento da extração, o teor de proteínas pelo método de Bradford e de carboidratos pelo método de Albalasmeh.
- Realizar a caracterização química estrutural das frações polissacarídicas através de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (IR), cromatografia de permeação em gel (GPC), ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio (RMN-C₁₃, RMN-H₁) e coerência quântica heteronuclear única (HSQC).
- Avaliar o efeito gastroprotetor do PSGC frente a etanol.
- Avaliar atividade antioxidante in vitro do PSGC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação da alga marinha

Amostras da espécie *Gracilaria cearensis* (registrada sob o número 19.642 no herbário ficológico do Laboratório de Ciências do Mar – LABOMAR, Universidade Federal do Ceará) foram coletados na praia do Flexeiras, município do Trairi, Ceará, Brasil, (coordenadas: 3° 13'05.7" S, 38° 15'59" W) em dezembro/2016, durante maré baixa, armazenados em sacos plásticos a -20° C e conduzidos ao Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). No laboratório, as algas foram lavadas com água destilada para retirada de epífitas e demais organismos incrustantes, e secos a 25 °C. Como mostra abaixo na figura 4.

Figura 4 - Excicata da alga marinha vermelha *Gracilaria cearensis*



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Uso de animais (camundongos swiss fêmea)

Foram utilizados camundongos fêmeas adultas (*Mus Musculus*), linhagem *Swiss*, pesando entre 20-25g, fornecidos pelo biotério central da UFC. Os animais receberam água e alimentação ad libitum. Todos os testes foram feitos com o objetivo de reduzir ao máximo o número de animais utilizados e visando o bem estar dos mesmos antes, durante e depois dos experimentos.

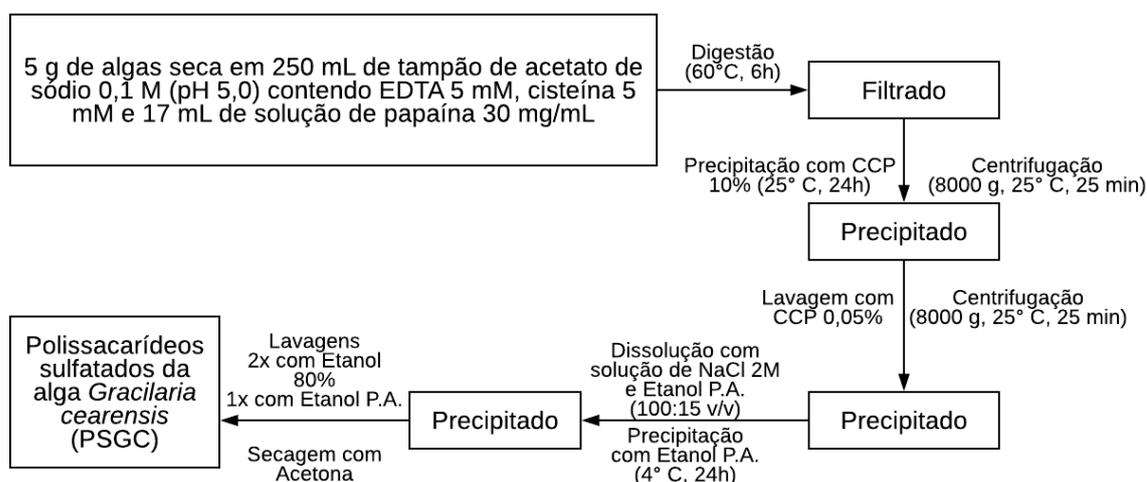
Os ensaios realizados seguiram os princípios éticos, a biossegurança e o respeito da experimentação animal; conduzidos de acordo com o *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health, Bethesda, MD) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará sob o número de 11/2013.

3.3 Extração enzimática dos polissacarídeos sulfatados totais

A extração enzimática foi realizada a partir do protocolo de acordo com (FARIAS *et al.*, 2000), modificado 5 g de alga seca foram maceradas e adicionadas a 250 mL de tampão de acetato de sódio, 0,1 M (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM, 5 mM de cisteína e 17 mL de solução de papaína 30 mg/mL. A solução fica incubada em banho maria por 24 h em temperatura de 60 °C. A solução foi centrifugada a 8000 x g por 30 minutos à temperatura de 25 °C para remoção do sobrenadante. O precipitado resultante foi adicionado com 16 mL de cloreto de cetilpiridina

(CPC) 10% p/v por 24 h. A solução foi centrifugada a 8000g por 30 minutos à temperatura de 25 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 300 mL de CPC 0,05%. Novamente a solução foi centrifugada a 8000 g por 30 minutos à temperatura de 25 °C. O precipitado resultante foi dissolvido em uma solução 2 M de etanol P.A. e NaCl (100:15 v:v) e deixado precipitar em 300 mL de etanol P.A. por 24 h. A solução foi centrifugada a 8000 g por 30 minutos à temperatura de 25° C, posteriormente a solução é lavada duas vezes com etanol 80% v/v e uma vez com etanol P.A. O precipitado resultante foi secado com acetona em superfície de vidro sobre aquecimento, para obtenção dos polissacarídeos sulfatados da espécie *Gracilaria cearensis* (PSGC). Como mostra na figura 5.

Figura 5- Esquema da extração enzimática do PSGC



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.1 Rendimento da extração

O rendimento dos PST obtidos em relação ao peso de alga utilizado para a extração foi calculado utilizando a seguinte fórmula do rendimento em % (Equação 1):

$$\frac{\text{Massa (g) do material seco obtido}}{\text{Massa (g) de macroalga seca para o processo de extração}} \cdot 100 \quad (1)$$

3.4 Caracterização química

3.4.1 Determinação de carboidratos totais

A quantificação dos carboidratos totais da *G. cearensis* (PSGC) foi obtida seguindo o método de Albalasmeh; Berhe & Ghezzehei (2013). A partir de uma solução de 1mg/mL de PSGC foram feitas três diluições nas seguintes proporções: 1:10, 1:20 e 1:30 (v/v). Em cada diluição foi separado 1mL de amostra acrescida de 3 mL de ácido sulfúrico P.A. e depositados em tubos de ensaio, seguido de agitação por 30 segundos. A solução resultante foi submetida em banho de gelo por 2 minutos para atingir a temperatura ambiente (pois a solução após a adição do ácido é bastante exotérmica). Foi feita a leitura de absorvância da solução a 315 nm em um espectrofotômetro ultravioleta (UV). Todas as concentrações foram realizadas em triplicata. Foi realizada a curva padrão de galactose substituindo os polissacarídeos por uma solução de galactose (10 a 100 µg/mL), permitindo assim a quantificação dos PSGC por correlação com a curva de calibração.

3.4.2 Determinação de proteínas

A quantidade de proteínas totais presentes na amostra de PSGC foi determinada pelo método Bradford (1976). A solução de Bradford foi produzida a partir de 50 mg de Comassie G-250 dissolvidos em 25 mL de álcool etílico sob agitação constante por 1 hora em erlenmeyer envolto com papel alumínio (para evitar degradação do reagente pela luz). Logo em seguida, adicionam-se 50 mL de ácido fosfórico 85% v/v. Foi aferido o volume da solução com água destilada em balão volumétrico de 500 mL. A solução resultante foi filtrada três vezes com papel de filtro no escuro e armazenada em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Foi produzida uma curva padrão com Albumina Sérica Bovina (BSA) com: 1,0 mL de solução de BSA em concentrações de 5 a 50 µg/mL, com 2,5 mL de solução de Bradford. Após 10 minutos, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro (SPECTRONIC INSTRUMENTS, modelo SPECTRONIC® 20 GENESYS™) em um comprimento de onda de 595 nm.

Para quantificar o teor de proteínas da amostra, foram utilizadas soluções de 1 mg/mL de polissacarídeos (PSGC), onde 1 mL foi adicionado a 2,5 mL de solução de Bradford. Após 10 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 595 nm. Todas as concentrações foram analisadas em triplicatas. Através das leituras obtidas das soluções das amostras e as da curva padrão de BSA foi possível quantificar valores estimados de proteínas presentes no PSGC.

3.4.3 Determinação de carbono e sulfato

A quantificação de carbono e sulfato nos polissacarídeos extraídos foram obtidos por microanálise elementar (Equipamento Perkin-Elmer CNH 2400). O grau de sulfatação foi determinado de acordo com método descrito por Melo *et al.*, (2002). O método de quantificação baseia-se na Equação 2:

$$\text{Teor de Sulfato (\%)} = \frac{\frac{S\%}{\text{Massa atômica S}}}{\frac{C\%}{\text{Massa atômica C.12}}} = 4,5 \cdot \left(\frac{S\%}{C\%}\right) \quad (2)$$

Devido os polissacarídeos serem formados por dissacarídeos alternados de β -D-galactopiranosose (Subunidade A) com α -D-galactopiranosose/ α -L-galactopiranosose ou 3,6-anidrogactose (Subunidade B). O teor de sulfatação é definido pela quantidade de grupamentos sulfato (OSO_3^-), ou átomos de enxofre (S), por unidade dissacarídica repetitiva, contendo 12 átomos de carbono.

3.5 Caracterização química estrutural

3.5.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

O valor de massa molar médio da amostra foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC), utilizando o equipamento Shimadzu com coluna Ultrahydrogel linear (7,8 x 300 mm), sob fluxo de 0,5 mL/min, contendo 0,5% de concentração de polissacarídeo e 0,1 M de solvente (NaNO_3) à 25°C. Um refractômetro diferencial e um fotômetro de raios ultravioleta (280 nm) foram utilizados como detectores de volume de

eluição, corrigido para o marcador interno de etileno glicol a 11,25 mL. Amostras de pululano (Shodex Denko) Mw de $5,9 \times 10^3$, $1,18 \times 10^4$, $4,73 \times 10^4$, $2,12 \times 10^5$, $7,88 \times 10^5$ g/mol foram usadas para o estabelecimento da curva padrão.

3.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho

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

3.5.3 Ressonância Magnética nuclear

Os espectros de ^1H e ^{13}C unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) de RMN foram realizados no Laboratório da Embrapa, na Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 - Pici, Fortaleza - CE, 60020-181, CE, Brasil. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ^1H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”.

As amostras foram preparadas dissolvendo-se 5 mg de PSGC em 500 μL de água deuterada com 1% de 2,2,3,3-d₄-(3-trimetilsilil)-propionato de sódio (TSP) para calibração espectral. O espectro unidimensional de ^1H foram obtidos a 60°C, com um tempo de espera entre cada aquisição de 2 s, aquisição de 32 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32k de número de pontos. Para auxiliar na atribuição dos sinais, foi realizado experimento bidimensional heteronucleares de ^1H - ^{13}C HSQC com 112, com um tempo de espera em cada aquisição de 1 s, janela em na dimensão do ^{13}C (F1) de 200 ppm e na dimensão do ^1H (F2) de 16 ppm, com números de pontos em F1 de 200 e F2 de 1974.

3.6 Atividade antioxidante

3.6.1 Capacidade antioxidante total

O teste da capacidade antioxidante total foi realizado utilizando 0,1mL da solução da

amostra com 1,0 mL de solução reagente: Ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônia 4 mM. A solução foi incubada em banho térmico a 95°C por 90min depois resfriada. Absorção da solução foi medida em 695 nm. A curva padrão foi construída utilizando soluções de ácido ascórbico. (MOHAN *et al.*, 2013). Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade, pela seguinte fórmula (equação 3):

$$\text{Capacidade antioxidante total (\%)} = \frac{A_a - A_b}{A_{ac} - A_b} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde: A_a = Absorbância do PSGC

A_b = Absorbância da solução reagente

A_{ac} = Absorbância da solução de ácido ascórbico

3.6.2 Quelação do íon ferroso

O teste de quelação do íon ferroso foi realizada utilizando 700 μL do PSGC em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50 mg/mL) adicionado à 700 μL de água destilada e 175 μL de FeSO_4 (0,5 mM). A solução foi agitada e absorvância (A_0) medida a 550 nm. Após a leitura de A_0 , foram adicionados 175 μL de Ferrozina (0,5 mM) à A_0 (A), a solução foi agitada por 1 minuto e incubada em temperatura ambiente por 20 minutos e a absorvância de (A) medida a 550 nm em espectrofotômetro. A atividade antioxidante da quelação do íon ferroso foi calculada usando a seguinte equação (4):

$$\frac{(A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}})}{A_{\text{Controle}}} \cdot 100 \quad (4)$$

$$\text{Onde, } A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}} = A_0 - (A - A_b) \quad (5)$$

Substituindo a equação (4) na equação (3), temos a seguinte atividade em (%):

$$\frac{A_0 - (A - A_b)}{A_0} \cdot 100 \quad (6)$$

Sendo, A_0 = Controle = FeSO_4 + Ferrozina;

A = Amostra + FeSO_4 + Ferrozina;

A_b = Amostra + Ferrozina. (WEN *et al.*, 2015)

3.6.3 Sequestro do Radical

Foram preparadas as soluções das amostras de PSGC nas concentrações de 200, 100,

50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL. O controle negativo consistiu em uma solução de etanol e DPPH. Adicionou-se as concentrações de PSGC uma solução de DPPH 300 µM. Nos ensaios brancos foram adicionados água destilada com o DPPH 300 µM. Após 40 minutos após a adição do DPPH, foram realizadas as leituras no espectrofotômetro a 515 nm. A atividade antioxidante devido a redução do DPPH foi calculada usando a seguinte equação (7):

$$\frac{A_0 - (A - A_b)}{A_0} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde: A_0 = DPPH; A = Amostra + DPPH; A_b = Amostra. (WEN *et al.*, 2015)

Onde: A_0 = DPPH; A = Amostra + DPPH; A_b = Amostra.

(Wen *et al.* 2015)

3.7 Atividade farmacológica

3.7.1 Modelo de inflamação gástrica induzida por etanol em camundongos

Grupos de 6 camundongos Swiss fêmeas ficaram em jejum por um período de 8h, em seguida foram tratados com o polissacarídeo extraído da alga *Gracilaria cearensis* (PSGC) nas concentrações de 0,3, 1, 3 e 10 mg/kg via gavagem. Após 30 minutos as lesões gástricas foram induzidas pela ingestão de álcool etílico 50% (0,5 mL/25 g), como descrito por (ROBERT, 1979), com algumas modificações. Os camundongos foram divididos em três grupos: Controle negativo, controle positivo (grupo etanol) e grupos tratados com PSGC.

O grupo controle negativo foi administrado somente com solução salina, a fim de preservar a integridade estomacal dos animais, o grupo do controle positivo (etanol) recebeu etanol 50% v/v via gavagem visando causar lesões gástricas e o grupo tratado com PSGC recebeu concentrações variadas (de 0,3 a 10mg/kg) e etanol 50% v/v.

Após 1 hora de administração do etanol, os animais foram sacrificados e seus estômagos removidos e abertos ao longo da grande curvatura, lavados com solução salina e fixados em superfície plana com o auxílio de alfinetes. Imagens digitalizadas foram feitas utilizando um referencial métrico e posteriormente analisadas com o programa Image J®. (MEDEIROS, 2009)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento da extração

A partir de 5 g da alga macerada e seca da *Gracilaria cearensis* foram obtidos 1,73 g de polissacarídeos sulfatados totais, correspondendo a um rendimento de 17,32 %. Esse rendimento está de acordo com o rendimento de outras espécies de algas vermelhas encontradas na costa do Brasil, conforme visto na tabela 2, apresentando valores que podem se modificar dependendo de vários fatores, como forma de extração, sazonalidade, espécie de alga. (NIL, 2015). Segue abaixo a tabela com os rendimentos de espécies de algumas algas vermelhas.

Tabela 2- Rendimento de espécies de algas vermelhas

Espécie	Rendimento %	Autor
<i>Gelidium sesquipedale</i>	22,34	Nil et al., 2015
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	7,2	Ribeiro et al., 2016
<i>Gracilaria caudata</i>	32,80	Barros et al., 2013
<i>Gracilaria birdiae</i>	6,50	Maciel et al., 2008
<i>Solieria filiformis</i>	19,14	Araújo et al., 2011
<i>Gracilaria Cearensis</i>	17,32	

Fonte: Elaborado pelo autor

O resultado encontrado no presente estudo demonstrou que *Gracilaria cearensis* apresenta um rendimento na extração enzimática de polissacarídeos similar ao de outras espécies de algas vermelhas, sendo superior à extração da *Gracilaria birdiae* e muito parecido com os valores da *S. filiformis* e *G. sesquipedale*, o único valor de extração bastante superior foi com relação ao da *G. cearensis* foi o da espécie *Gracilaria caudata*. A composição química de carboidratos dos PSGC correlacionadas com a curva de calibração, apontam para um percentual de 66,67%. O Valor é considerado alto quando comparado a outras espécies de algas vermelhas. Foi encontrado teor de carboidratos de 50,2% para *Solieria filiformis* (SOUSA, 2015) 36,7 para *Gracilaria intermedia* (COSTA, 2014).

Tabela 3- Porcentagem de carboidrato total de algas vermelhas

Espécie	Carboidratos totais (%)	Autor
<i>Gracilaria gracilis</i>	30,00	ASSREUY <i>et al.</i> , 2008
<i>Halymenia pseudofloresia</i>	47,14	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2009
<i>Gelidiella acerosa</i>	89,5	CHAGAS <i>et al.</i> , 2018
<i>Gracilaria cearenses</i>	66,67	

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Determinação de proteínas

Não foram obtidos valores significativos de proteínas (< 0,01 %), indicando que o método de extração enzimática de polissacarídeos com papaína mostrou-se eficaz e bem específico para polissacarídeos.

4.3 Determinação de carbono e sulfatos

As amostras dos PSGC apresentaram 1,78% de enxofre e 30,45% de carbono, permitindo assim calcular o grau de sulfatação do material, correspondente a 7,35% (tabela 3). O grau de sulfatação obtido foi conforme o esperado, pois, em geral, agaranas apresentam baixa sulfatação em sua estrutura, enquanto que carragenanas apresentam alto grau de sulfatação (LAHAYE, 2001; USOV, 1998; VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Como mostra na tabela 3.

Tabela 4- Microanálise elementar do PSGC

	Enxofre (%)	Carbono (%)	Grau de Sulfatação (%)

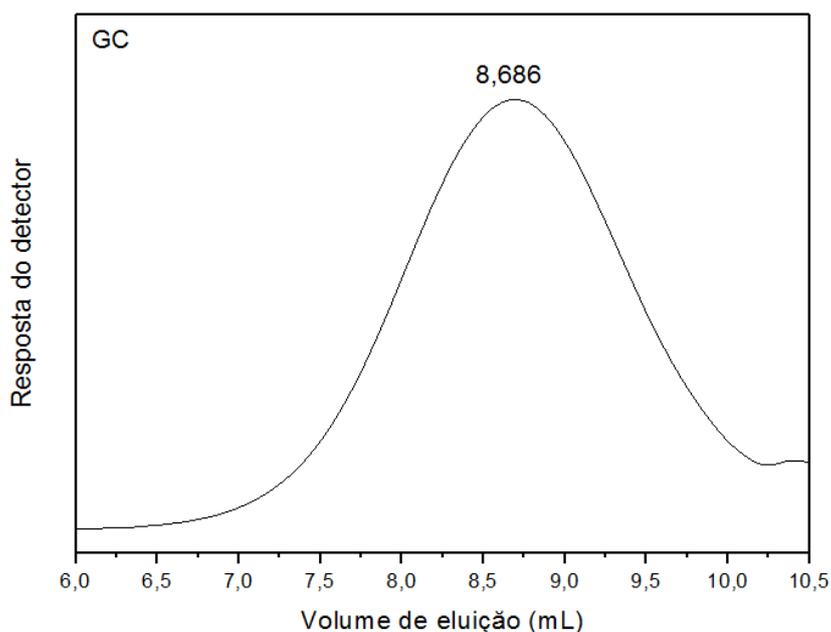
PSGC	1,71±0,30	30,45±0,57	7,35
------	-----------	------------	------

Fonte: Elaborado pelo autor

4.4 Cromatografia de permeação em gel (GCP)

A amostra PSGC apresenta um único pico simétrico na cromatografia de Permeação em gel (GPC) (gráfico 1) cujo volume de eluição de 8,686 mL com um peso molecular médio de 246,34 KDa. O pico no espectro demonstra um comportamento polidisperso, indicando que PSGC é um conjunto de polissacarídeos com pesos molares próximos um dos outros, devido a pequenas variações nas repetições dos dissacarídeos constituintes do polissacarídeo. Sem absorção a 280 nm e uma resposta negativa ao método de Lowry (LOWRY *et al*, 1951) confirmam que a amostra PSGC não contém traços de proteínas.

Gráfico 1 - Cromatografia de Permeação em gel da amostra PSGC



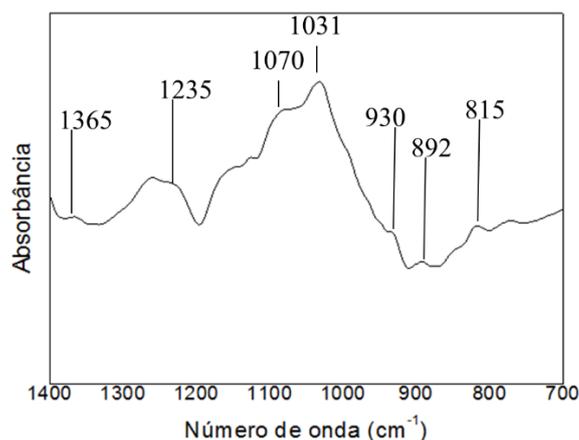
Fonte: Elaborado pelo autor

4.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A análise espectroscópica no infravermelho da amostra PSGC (Gráfico 2) apresenta sinais em 1235 cm^{-1} indicando o estiramento do grupo sulfato, 1365 cm^{-1} indica ésteres

sulfatados (LLOYD, 1961). A banda a 930 cm^{-1} foi atribuída à absorção de 3,6-anidrogalactose e a 815 cm^{-1} foi atribuída à absorção do grupo sulfato ligado na posição C-6 de galactose (BRASCH, 1981), O sinal de 1070 cm^{-1} e 1031 cm^{-1} uma estrutura de galactana. (SEKKAL *et al.*, 1993), o pico de 892 cm^{-1} , correspondente ao grupo dos ágaes (MOLLET; RHAOUI; LEMOINE, 1998) o sinal de 815 cm^{-1} identifica a posição do grupo sulfato em biopolímeros de ágar (CHOPIN; WHALEN, 1993).

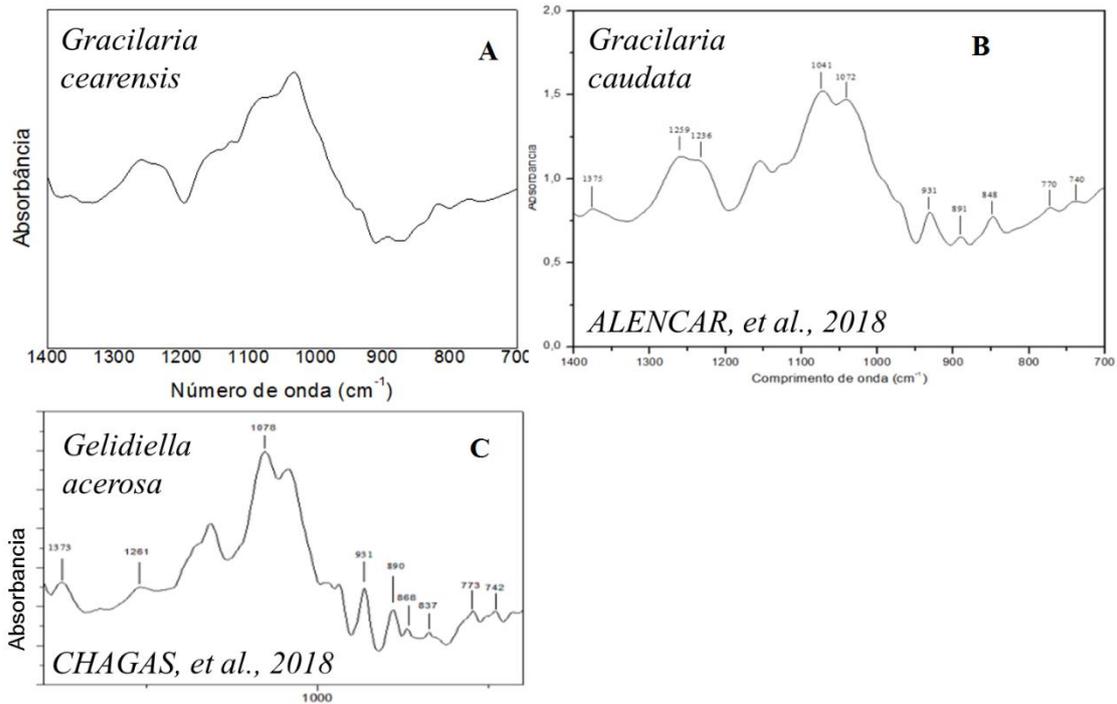
Gráfico 2- Espectroscopia de absorção na região do infravermelho do PSGC



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi observado que o comportamento do gráfico de GPC do PSGC apresentou similaridades com relação ao GPC de outras algas estudadas pelo nosso grupo de estudo. (Gráfico 2)

Gráfico 3 - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho de algas vermelhas



Fonte: ALENCAR; CHAGAS, 2018

A: *Gracilaria cearensis*

B: *Gracilaria caudata*,

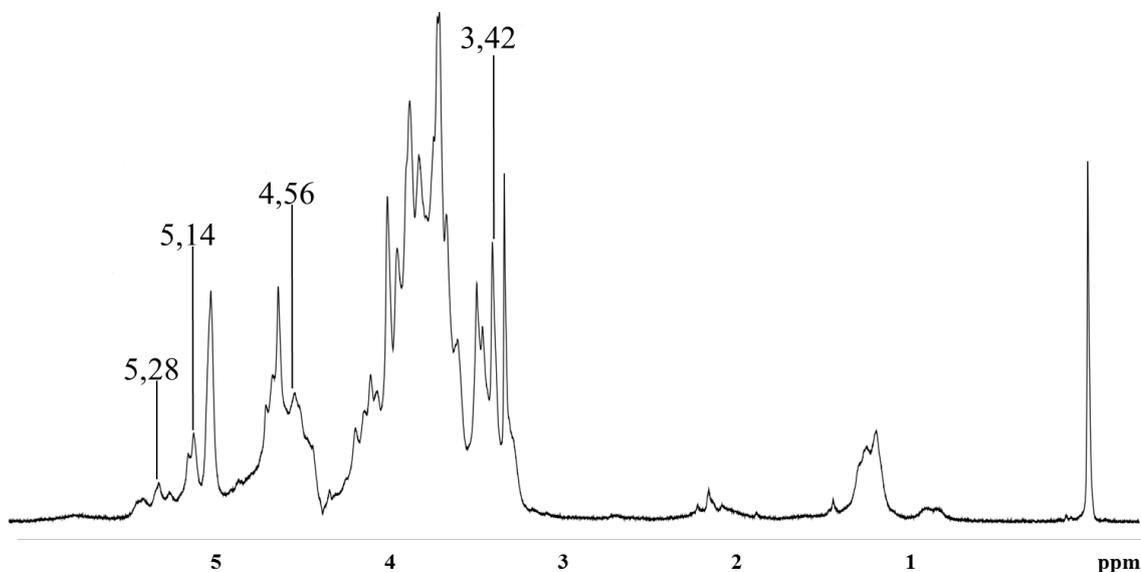
C: *Gelidiella acerosa*.

4.6 Espectro de ressonância magnética nuclear

O espectro de RMN-¹H é mostrado no gráfico 3. O espectro de PSCG, apresenta as ressonância anomérica em 5,14 atribuído à 3,6 α - L- anidrogactose (LA) (LAHAYE, *et al.*, 1989). O sinal a 5,28 ppm no espectro ocorre ao próton anomérico das unidades de -gactose-6-sulfato (G6S), o sinal 4,56 ppm foi atribuído ao próton anomérico de glicose (G), o sinal 3,42 corresponde a um grupo metil ligado no carbono 6 (C6M). (USOV *et al.*, 1997).

Gráfico 4 - Espectro de RMN-H1 PSCG

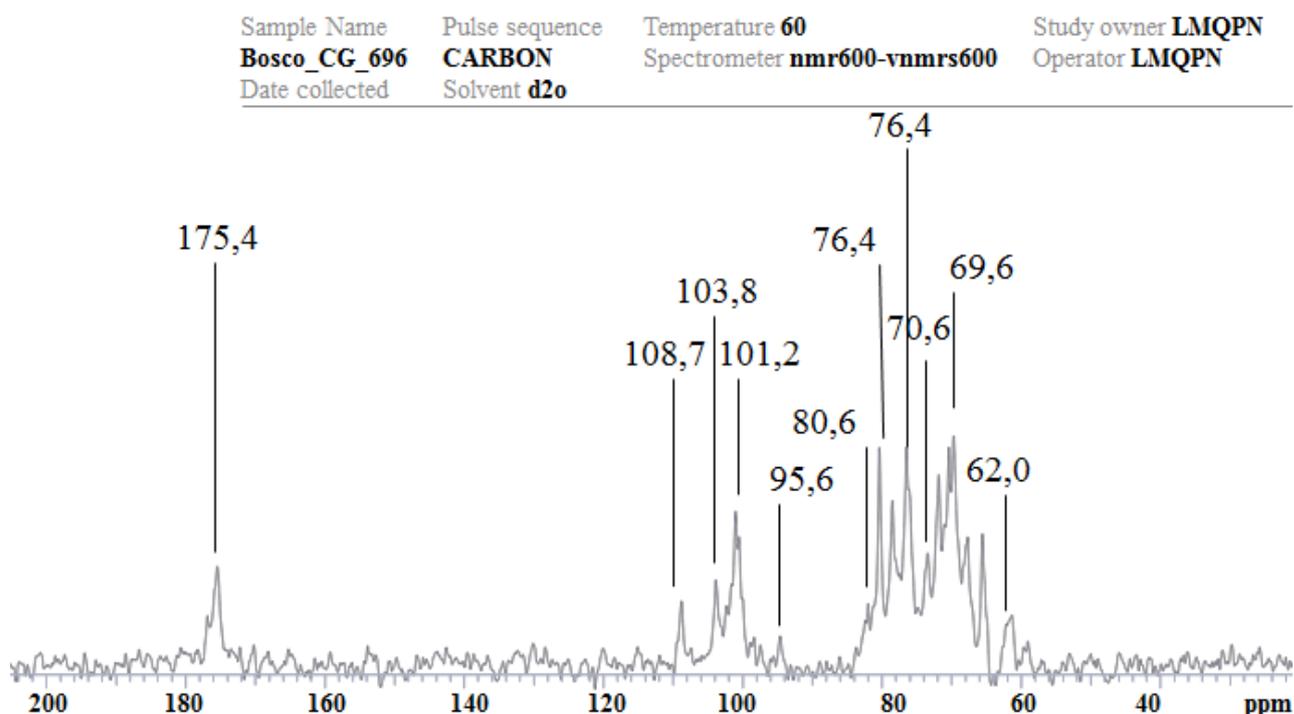
Sample Name	Pulse sequence	Temperature	Study owner
Bosco_CG_696	PRESAT	60	LMQPN
Date collected	Solvent	Spectrometer	Operator
	d2o	nmr600-vnmrs600	LMQPN



Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo o espectro de RMN-C₁₃ apresentado no gráfico 5, as unidades alternadas da agarose e anidro galactose foram detectados a partir dos sinais correspondentes. Apresentando estrutura típica de porfirano, (unidades de (1 → 3) -6-anidro-1-galactose e unidades 6-sulfato de -1-galactose ligadas por (1 → 4)). Os sinais entre 95,6, 101,1 e 103,8 mostram d-galactose ligada a 3,6-1-anidro galactose. (PEYMAN, 2010). O sinal 175,4 correspondente ao grupo carboxil e metil na forma R do acetal. (DUARTE, 2004). O sinais 101,2, 70,6, 80,6, 69,6, 76,4 e 62 correspondem aos carbonos 1 ao 6 de uma glicose. O sinal de 76,4 corresponde a um grupo metóxido ligado ao carbono 6 (PEYMAN, 2010)

Gráfico 5 - Espectro de RMN-C13 PSGC



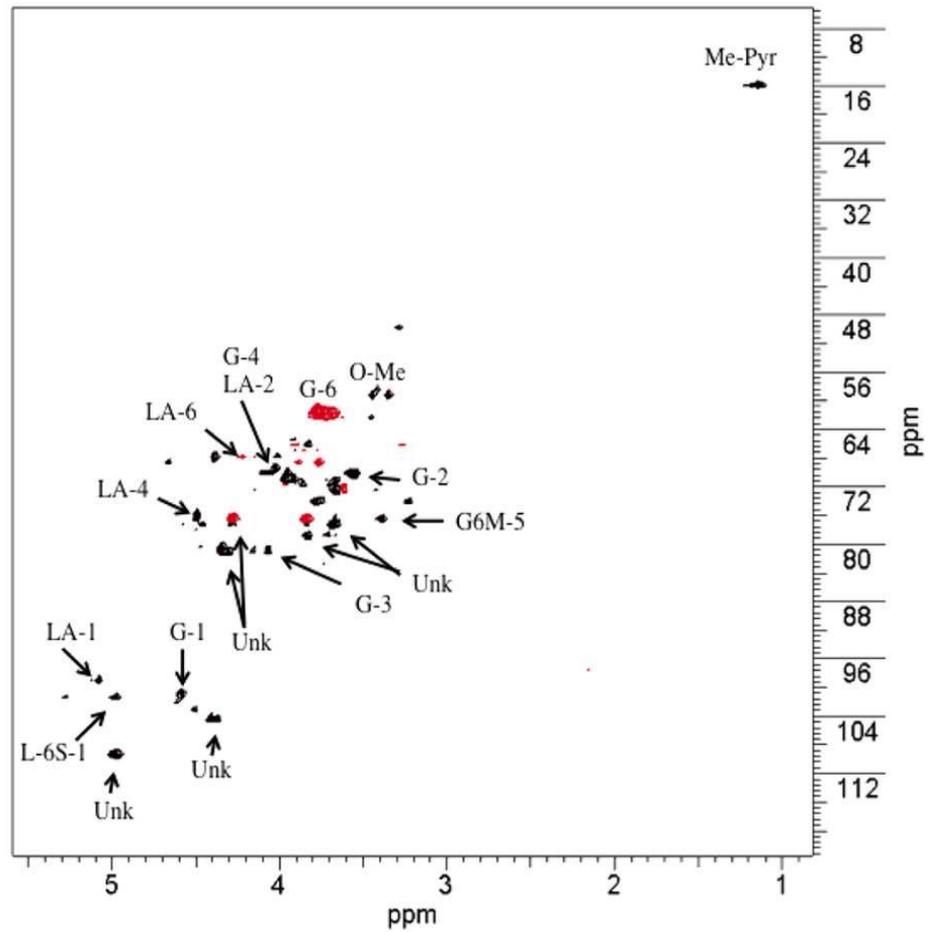
Fonte: Do autor

4.7 Espectroscopia de coerência quântica heteronuclear única (HSQC)

Segundo a Espectroscopia de coerência quântica heteronuclear do PSGC no gráfico 6 mostra uma única região de hidrogênios anoméricos, observa-se o hidrogênio em δ 4.60 com carbono em δ 101,2: Atribuindo a galactose (G-1) ligada a anidro-galactose. No hidrogênio δ 5.08 com carbono em δ 99.2, atribui-se ao hidrogênio anomérico da anidro-galactose (L-1).

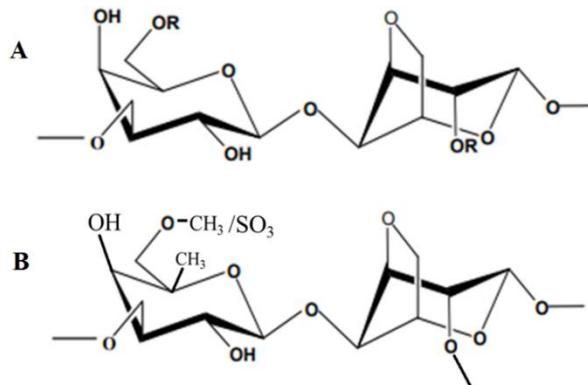
O sinal em δ 4.98 com carbono em δ 101.9 são atribuídos ao anomérico do resíduo de 6-O-sulfato-l-galactopiranosose (L-6S-1). É possível observar também que existe a forma metoxilada (R-O-CH₃) deste polissacarídeo já que é possível notar o sinal em δ 3.44 com carbono em δ 58.4, atribuído a metoxila ligada ao carbono 6 do resíduo de galactose (G6-O-Me). Sendo que a estrutura do polissacarídeo pode se comportar como uma agarose do tipo furonano de possível estrutura: α -1-3-(6-O-Me)-D-galactose- β -1-4-(6-S)-L-A-Galactose. Os demais sinais estão apresentados na Tabela 4.

Gráfico 6 - HSQC do PSGC



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6 - A- Estrutura de uma Galactana; 6 B- Estrutura do PSGC: Agarose Furonano α -1-3-(6-O-Me)-5-Me-D-galactose- β -1-4-L-A-Galactose-Acetal



Fonte: DELATTRE; FENORADOSOA; MICHAUD, 2011)

A: estrutura padrão de uma agarana (furonana), onde R podem ser grupos metilados ou sulfatados;

B: estrutura do PSGC obtido.

Tabela 5- Deslocamentos químicos de RMN 1H e 13C para PSGC

# C	PSGC		LITERATURA		Autor(es)
	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)	
G-1	4.60	101.2	4.56	102.5	Usov <i>et al.</i> (1980); Valiente <i>et al.</i> (1992)
G-2	3.56	70.6	3.62	70.37	
G-3	4.12	80.9	3.75	82.3	
G-4	4.04	69.6	4.10	68.9	
G-5	-	-	3.71	75.4	
G-6	3.76	62.0	3.78	61.5	
LA-1	5.08	99.2	5.13	98.5	Lai e Lii (1998); Lahaye (2001)
LA-2	4.05	70.3	4.10	69.9	
LA-3	4.30	78.7	4.51	80.2	
LA-4	4.50	76.2	4.66	77.5	
LA-5	4.47	77.6	4.55	75.6	
LA-6	4.22	68.2	4.10	69.5	
G6M-OMe	3.44	58.4	3.41	59.1	Miller e Furneaux (1997)
G6M	3.62	72.4	-	71.8	
G5M	3.40	76.7	-	73.6	
LG-6S	4.98	101.9	5.34	101.2	Lahaye <i>et al.</i> (1989)

Fonte: Elaborado pelo autor.

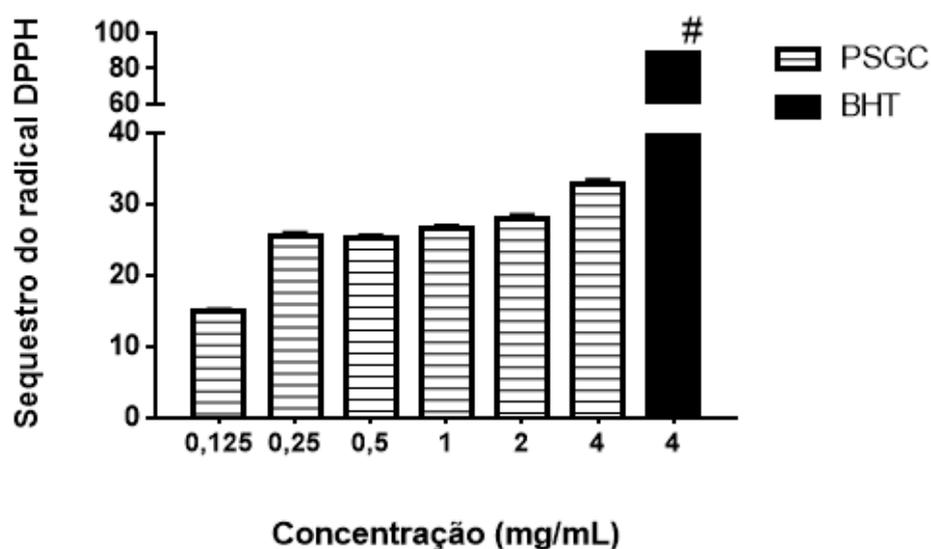
Legenda: – não observado

4.8 Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DDPH)

A atividade antioxidante produzida pela redução do radical livre DPPH foi observada

de forma crescente em função das concentrações de PSGC, havendo um aumento na capacidade de sequestro do radical DPPH à medida que concentração do PSGC aumentou, sendo que o melhor valor no teste antioxidante foi de 32,96% na concentração de 4 mg/mL, como mostra no gráfico 7.

Gráfico 7- Concentração da Atividade antioxidante (DPPH) do PSGC



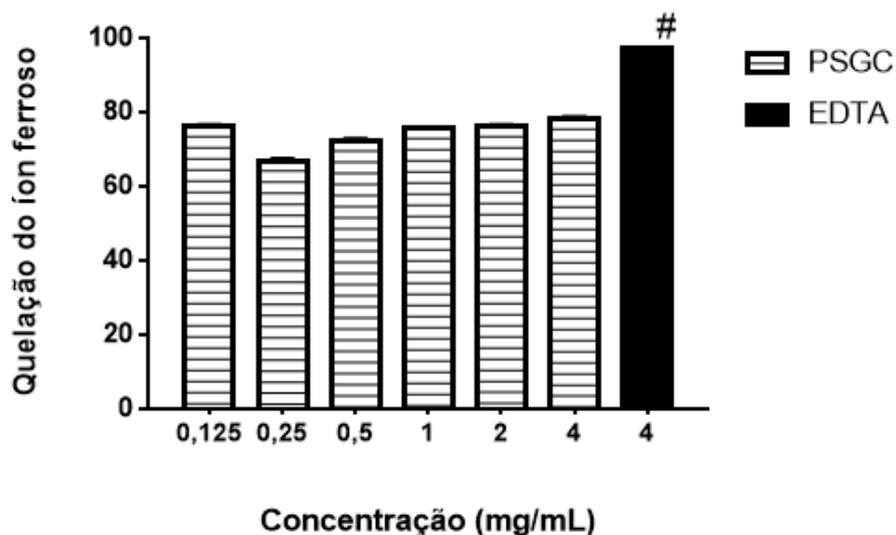
Fonte: Elaborado pelo autor

4.9 Quelação do íon ferroso

A atividade antioxidante, produzida pela redução da quelação do íon ferroso foram observados de forma crescente em função das concentrações de PSGC, havendo um aumento na capacidade antioxidante à medida que concentração do PSGC aumentou, sendo que o melhor valor no teste antioxidante foi de 78,22 % na concentração de 4mg/mL no gráfico 6.

Os dados obtidos na quelação do íon ferroso (Gráfico 7) indicam que o polissacarídeo sulfatado da alga *G. cearensis* (PSGC) atuam como agente quelante de ferro, reduzindo o potencial oxidativo, podendo desempenhar papel de biomolécula antioxidante.

Gráfico 8 - Atividade antioxidante (Quelação do íon ferroso) do PSGC



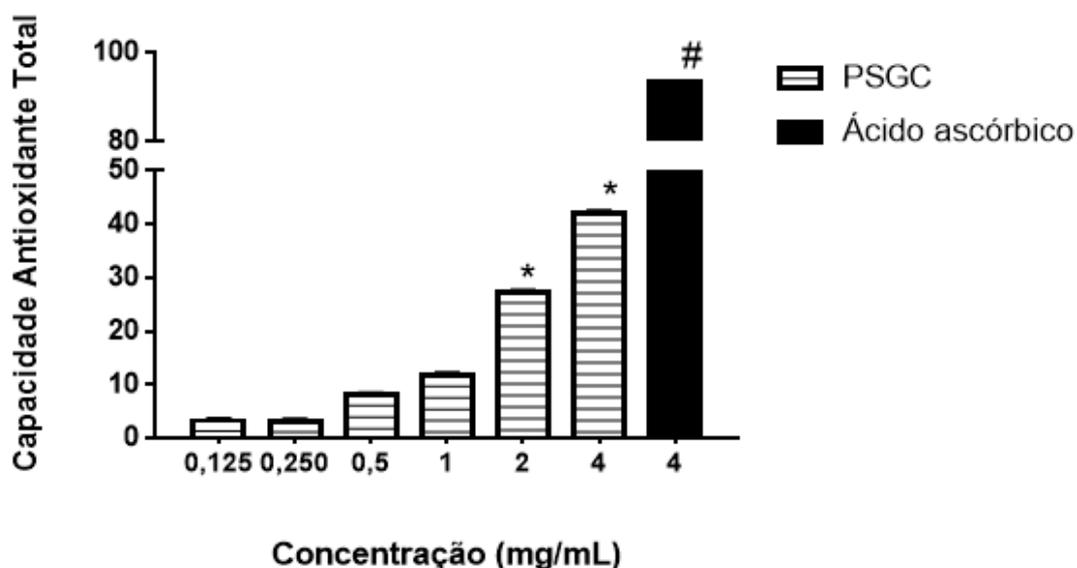
Fonte: Elaborado pelo autor

4.10 Capacidade antioxidante total pela formação do complexo fosfomolibdênio

A formação do complexo fosfomolibdênio consiste na redução do metal de transição Molibdênio ($\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+}$) causado pelo agente redutor (PSGC), complexando o molibdênio com fósforo em meio ácido, resultando no fosfomolibdênio, (reagente de coloração azul).

O Polissacarídeo sulfatado da *G. cearensis* apresentou atividade na formação do complexo fosfomolibdênio (Gráfico 8). Obtendo na concentração de 4 mg/mL 49,2% de atividade antioxidante.

Gráfico 9 - Atividade antioxidante (formação do complexo fosfomolibdênio).



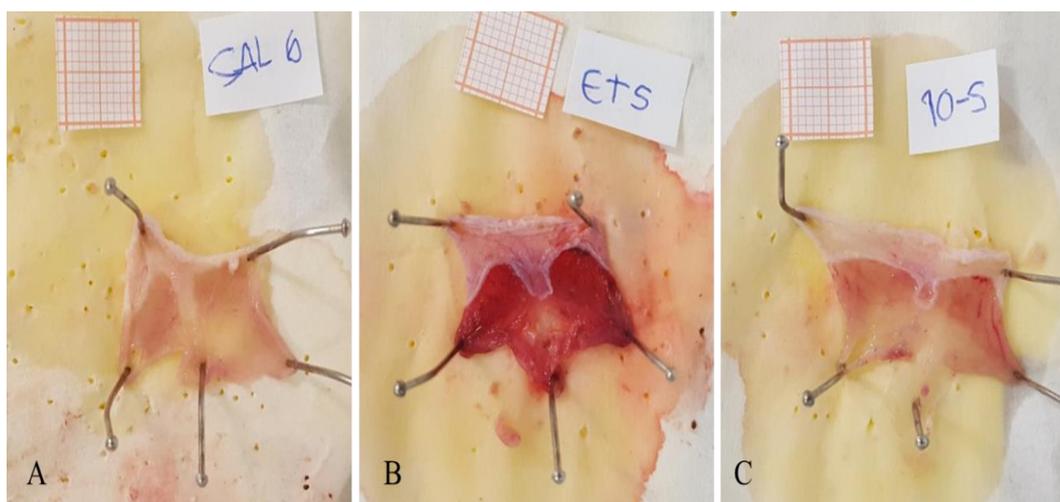
Fonte: Elaborado pelo autor

4.11 Atividade do PSGC no modelo de Gastroproteção

O programa de computador foi utilizado ImageJ® para determinar a área dos estômagos que sofreram lesões gástricas induzida pelo etanol 50% v/v, utilizando como referência um pedaço de papel milimetrado de área de 1 mm² a partir de imagens digitais obtidas no momento de abrir os estômagos no experimento de gastroproteção (figura 7).

A degradação da mucosa estomacal a formação de úlceras em modelos experimentais é devido ao desequilíbrio do muco, do bicarbonato, das prostaglandinas, substâncias reativas de oxigênio, ácido clorídrico, enzimas digestivas, dentre outras substâncias (MATSUHASHI, 2007). Devido ao consumo constante de álcool pelo ser humano tem sido cada vez mais comum o aparecimento de doenças ligadas a lesões gástricas, podendo evoluir para quadros mais sérios como a gastrite estomacal e até mesmo o câncer devido a constante degradação mucosa estomacal.

Figura 7- Estômagos dos camundongos no teste de Gastroproteção



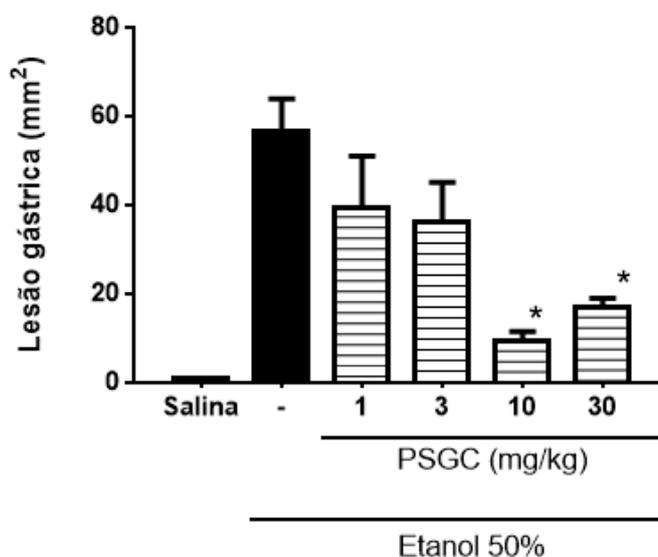
Fonte: Elaborado pelo autor

A: Estômago tratado somente com solução salina, B: Estômago tratado com solução etanol (50% v/v), C: Estômago tratado com etanol 50% v/v e concentração de 10 mg/kg de PSGC.

Observou-se que o etanol causou uma média de área lesada de 56,43 % da área total do estômago. As concentrações de PSGC foram capazes de reduzir a área de lesão, em que a concentração de PSGC de 1 mg/kg reduziu a lesão em 16,84%, a concentração 3 mg/kg em 20,41%, a concentração de 10 mg/kg em 47,04% e a concentração de 30 mg/kg em 39,04%. O melhor resultado foi obtido na concentração de 10 mg/kg, mostrando que a atividade gastroprotetora do PSGC não é dose dependente (gráfico 10).

Dessa maneira fármacos anti-histamínicos e inibidores da bomba de prótons (IBPs) como o omeprazol têm sido cada vez mais receitados, e estes por sua vez também causam diversos problemas secundários em tratamentos crônicos (MASSOOMI, 1993) e (HECKMANN; BIRKLEIN, 2000). Sendo assim, o estudo de biomoléculas ativas, como os polissacarídeos sulfatados de algas para tratamentos de lesões gástricas pode ser uma ótima opção de tratamento frente aos atuais fármacos gastroprotetores, podendo em um futuro próximo ser utilizados como princípios ativos principais em novas drogas para esta finalidade.

Gráfico 10 - Atividade Gastroprotetora do PSGC



Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico 9 apresenta a ação gastroprotetora do polissacarídeo sulfatado da alga *G. cearensis* (PSGC) frente a degradação da mucosa estomacal de camundongos pela ação do etanol 50% v/v. Foi observado que todas as concentrações do polissacarídeo reduziram a área do dano gástrico observado, onde a melhor resposta foi obtida na concentração de 10 mg/mL, concentração em que apenas 9,39% do estômago sofreu lesões pela ação do etanol.

Foi observado que a utilização do PSGC protegeu a mucosa gástrica dos estômagos dos camundongos frente à lesão causada pela ingestão do etanol, demonstrando poder ser utilizado como substância bioativa de ação gastroprotetora, ainda assim se fazem necessários mais estudos com a finalidade de maximizar os resultados positivos, sendo estes estudos focando em testes de doses repetidas e estudos crônicos de lesão estomacal.

5 CONCLUSÃO

A amostra PSGC extraída da alga vermelha *Gracilaria cearensis* apresentou um bom rendimento de extração, de 17,32 % de polissacarídeos sulfatados, demonstrando valores parecidos com os de outras espécies de rodófitas, demonstrando que o método de extração enzimática por papaína é uma boa metodologia de extração. Através das análises químicas estruturais podemos concluir que o PSGC apresentou uma estrutura dissacarídica estrutural

composta de D-galactose como subunidade A e 3,6-L-anidrogactose como subunidade B, em que hidroxilas 3- β -D-galactopiranosose e 4- α -L-galactopiranosose são substituídos por grupos sulfatos ou grupos metilados, caracterizando uma molécula de agarana, do tipo porfirano. O PSGC apresenta excelentes valores de gastroproteção, chegando ao valor de 82%, na concentração de 10 mg/kg, frente à corrosão ácida da mucosa estomacal de camundongos, causada por etanol. Sabendo que o etanol atualmente é um dos principais causadores de problemas gástricos, pela constante ingestão, causando inflamações, lesões e câncer estomacal e uma droga baseada em polissacarídeos de algas, como o PSGC, apresenta função gastroprotetora bastante eficaz, podemos considerar o uso dessas biomoléculas como forma de tratamento em lesões estomacais em humanos, minimizando assim a degradação da mucosa do estômago, e possibilitando sua recuperação. Além da Gastroproteção, bons valores de antioxidantes em testes *in vitro*, foram apresentados através do uso do PSGC, principalmente no teste de antioxidação *in vitro* de quelação do íon ferroso, demonstrando ser uma biomolécula bastante interessante em estudos biológicos. Devido sua capacidade antioxidante de quelação de ferro, espera-se que seu mecanismo de ação antioxidante seja a quelação de íons hidroxila, sendo estes presentes em grandes quantidades em meios onde o equilíbrio homeostático esteja desbalanceado, seja pela alteração enzimática estomacal, acúmulo de citosinas inflamatórias ou até mesmo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS). Dessa maneira a utilização de polissacarídeos de algas pode auxiliar ou vir a substituir parcialmente ou até mesmo integralmente a utilização de fármacos anti-histamínicos ou inibidores de bomba de prótons, como o omeprazol, melhorando muito a saúde de pacientes que utilizam desses medicamentos em tratamentos crônicos. Além dos dados farmacológicos o estudo de polissacarídeos sulfatados de algas apresentam vantagens como fácil obtenção e extração, estabilidade química de sua estrutura, além serem biomoléculas ativas que estão demonstrando que podem apresentar diversas propriedades farmacológicas distintas, sendo biomoléculas que a cada dia estão sendo mais estudadas.

REFERÊNCIAS

- ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A.. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 97, n. 2, 2013, p.253-261.
- BOHN, John A.; BEMILLER, James N.. (1→3)-β-d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 28, n. 1, 1995, p.3-14.
- BIRD, C.J.; MCLACH, L. J. Taxonomy of Gracilaria: Evaluation of some Aspects of Reproductive Structure. **Hydrobiologia**, 1984, v. 116/117, p. 41-46.
- BHARDWAJ, Tilak R. *et al.* Natural Gums and Modified Natural Gums as Sustained-Release Carriers. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, [s.l.], v. 26, n. 10, 2000. p.1025-1038.
- BRAGA, Muriele Picoli; SILVA, Cristiane de Bona da; ADAMS, Andréa Inês Horn. Inibidores da bomba de prótons: revisão e análise farmacoeconômica. **Saúde (santa Maria)**, [s.l.], v. 37, n. 2, 2012, p.19-33.
- BRADFORD, Marion M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, 1976, p.248-254.
- BRASCH, Donald J. *et al.* The galactan sulfate from the edible, red alga *Porphyra columbina*. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 97, n. 1, 1981, p.113-125.
- BRASIL. Ministério da Educação. Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Portaria nº 206, de 4 de setembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 172, 5 set. 2018. Seção 1, p. 22.
- CABRITA, Maria Teresa; VALE, Carlos; RAUTER, Amélia Pilar. Halogenated Compounds from Marine Algae. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 8, n. 8, 2010, p.2301-2317.
- CHOPIN, Thierry; WHALEN, Ellen. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 246, n. 1, 1993, p.51-59.
- DANGELO, J. G; FATTINI, C.A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.
- DELATTRE, Cedric; FENORADOSOA, Taratra Andrée; MICHAUD, Philippe. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [s.l.], v. 54, n. 6, 2011, p.1075-1092.

DINIZ, Lúcio Ricardo Leite *et al.* Gastroprotective effects of the essential oil of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. on gastric ulcer models. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 149, n. 3, 2013, p.694-700.

DUARTE, Maria E.r. *et al.* The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 339, n. 2, 2004, p.335-347.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W.. The structure of agar. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 16, n. 1, 1971, p.189-197.

ENZING, C; PLOEG, M.; BARBOSA, M; SIJTSMA, L. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. (Eds.) Vigani, M; Parisi, C; Rodríguez Cerezo, E. **JRC Scientific and Policy Reports**, 2014.

FREDERICQ, S.; HOMMERSAND, M. H. Diagnoses and key to the genera of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, 1990, v. 204/205, p. 173-178.

GENICOT-JONCOUR, S. *et al.* The Cyclization of the 3,6-Anhydro-Galactose Ring of - Carrageenan Is Catalyzed by Two D-Galactose-2,6-Sulfurylases in the Red Alga *Chondrus crispus*. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 151, n. 3, 2009, p.1609-1616.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 715-723

HECKMANN, J. G.; BIRKLEIN, F.; NEUNDÖRFER, B. Omeprazole-induced delirium. **Journal Of Neurology**, [s.l.], v. 247, n. 1, 2000, p.56-57.

KNUTSEN, S. H. *et al.* A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans. **Botanica Marina**, [s.l.], v. 37, n. 2, 1994, p.163-170.

KUPFER, Yizhak; CAPPELL, Mitchell S.; TESSLER, Sidney. ACUTE GASTROINTESTINAL BLEEDING IN THE INTENSIVE CARE UNIT. **Gastroenterology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 29, n. 2, 2000, p.275-307.

LAI, V. M. F, HUANG, A. L.; LII, C. Y. Rheological properties and phase transition of red algal polysaccharide-starch composites. **Food Hydrocol**, Oxford., v.13, p.409-418, 1999.

LAHAYE, Marc; ROCHAS, Cyrille; YAPHE, Wilfred. A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in the cell walls of *Gracilaria* spp. (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Canadian Journal Of Botany**, [s.l.], v. 64, n. 3, 1986, p.579-585.

LAHAYE, M., YAPHE, W., The Chemical structure of agar from *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville, *G. cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. damaecornis* J. Ag and *G. domingensis* Sonder ex Kützing (**Gigartinales, Rhodophyta**). *Bot. Mar.* 32, 369–377, 1989.

LAHAYE, M., Developments on gelling algal galactans, their structure and physicochemistry. **Journal of Applied Phycology**, 2001, v. 13, p. 173–184.

- LIM, S. N. *et al.* Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from a Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [*s.l.*], v. 50, n. 13, 2002, p.3862-3866.
- LLOYD, A. G.; DOGSON, K. S.; PRICE, R. G.; ROSE, F. A. Infrared studies on sulphate esters. I. Polysaccharide sulphates. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 46, 1961, 108–115.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 1951, 265–275.
- MCHUGH, D. J. A guide to seaweed industry. **FAO Fisheries Technical Paper**. n. 441, FAO, Rome, 2003, p. 105.
- MATSUHASHI, Tamotsu *et al.* Protective Effect of a Novel Rice Extract Against Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rat. **Digestive Diseases And Sciences**, [*s.l.*], v. 52, n. 2, 2007, p.434-441.
- MASSOOMI, F.; SAVAGE, J.; CHRISTOPHER J. Destache, .Omeprazole: A Comprehensive Review, **Pharmacotherapy**, p. 46-59, 1993.
- MILLER, I.J., FURNEAX, R.H., The structural determination of the agaroid polysaccharides from four New Zealand algae in the order Ceramiales by means of ¹³C NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, 333–339, 1997.
- NDHLALA, Ashwell; MOYO, Mack; VAN STADEN, Johannes. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?. **Molecules**, [*s.l.*], v. 15, n. 10, 2010, p.6905-6930.
- OLIVEIRA, Eurico Cabral. Taxonomic criteria in the genus *Gracilaria* Grev . (**Phodophyta**): An experience with the western Atlantic species. Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, 1984.
- PANDEY, Madan Mohan *et al.* An Important Indian Traditional Drug of Ayurveda Jatamansi and Its Substitute Bhootkeshi: Chemical Profiling and Antioxidant Activity. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, [*s.l.*], v. 2013, 2013, p.1-5.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004
- RAPOSO, Maria de Jesus; MORAIS, Alcina de; MORAIS, Rui de. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. **Marine Drugs**, [*s.l.*], v. 13, n. 5, 2015, p.2967-3028.
- SALIM, Samina. Oxidative Stress and Psychological Disorders. **Current Neuropharmacology**, Bentham Science Publishers [*s.l.*], v. 12, n. 2, 2014, p.140-147.
- SALEHI, Peyman *et al.* Structural and compositional characteristics of a sulfated galactan from the red alga *Gracilariopsis persica*. **Carbohydrate Polymers**, [*s.l.*], v. 83, n. 4, 2011, p.1570-1574.

SEKKAL, Majda *et al.* Direct structural identification of polysaccharides from red algae by FTIR microspectrometry II: Identification of the constituents of *Gracilaria verrucosa*. **Mikrochimica Acta**, [s.l.], v. 112, n. 1-4, 1993, p.11-18.

SCHUBERT, Mitchell L.. Gastric secretion. **Current Opinion In Gastroenterology**, [s.l.], v. 27, n. 6, 2011, p.536-542.

Trainor, F.R. Em *Algae as Ecological Indicators*; Shubert, L. E., ed.; **Academic Press**: UK, 1983.

USOV, A. I.; BILAN, M.I.; SHASHKOV, A.S. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcereous red alga *Corallina pulifera* (Rhodophyta, Corallinaceae). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 303, p. 93-102, 1997.

VELÍLEK, J.; CEJPEK, K. Biosynthesis of food constituents: Saccharides. 1. Monosaccharides, oligosaccharides, and related compounds – a review. **Czech Journal Of Food Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 4, 2011, p.129-144.

VIDOTTI, Eliane Cristina; ROLLEMBERG, Maria do Carmo E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.139-145, fev. 2004.

YAMAGUCHI, Tomoko *et al.* HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 62, n. 6, 1998, p.1201-1204.

YUAN, H *et al.* Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 243, n. 2, 2006, p.228-234, 18.