



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

LUÍS EDUARDO CASTANHEIRA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL, PROPRIEDADES REOLÓGICAS
E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO POLISSACARÍDEO HIDROLISADO E
SULFATADO DA ALGA *Gracilaria intermedia***

FORTALEZA

2020

LUÍS EDUARDO CASTANHEIRA COSTA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL, PROPRIEDADES REOLÓGICAS E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO POLISSACARÍDEO HIDROLISADO E SULFATADO
DA ALGA *Gracilaria intermedia*

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

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

FORTALEZA

2020

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)

C873c Costa, Luís Eduardo Castanheira.

Caracterização químico-estrutural, propriedades reológicas e atividades biológicas do polissacarídeo hidrolisado e sulfatado da alga Gracilaria intermedia / Luís Eduardo Castanheira Costa. – 2020.
118 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. Gracilaria intermedia. 2. Gelificante. 3. Antioxidante. 4. Cicatrizante. I. Título.

CDD 572

LUÍS EDUARDO CASTANHEIRA COSTA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL, PROPRIEDADES REOLÓGICAS E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO POLISSACARÍDEO HIDROLISADO E SULFATADO
DA ALGA *Gracilaria intermedia*

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Ponte Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas, pelo acolhimento em seu laboratório, ter confiado em mim e ter proporcionado um bom ambiente de trabalho, seu respeito, gentileza e por ter contribuído para o meu crescimento científico e pessoal ao longo dos anos em que convivemos.

Aos amigos do Laboratório de Carboidratos e Proteínas de Algas Marinhas, Agnes Nobre, Carla Vivianne, Clark Barros, Diego Chagas, Felipe Bezerra, Poliana Cavalcante, Valesca Nobre, Vanessa Cosme e Willer Malta pela ajuda de maneira direta ou indireta na pesquisa e todos os momentos vividos durante esses anos desenvolvendo a pesquisa

Aos professores doutores membros da banca por gentilmente aceitarem em participar da avaliação deste trabalho.

Ao professor Renato de Azevedo Moreira pela disponibilidade de colaboração e realização dos experimentos cicatrizantes.

Ao Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacológica Gastrointestinal da UFC, pela disponibilidade de colaboração e realização dos experimentos cicatrizantes.

Ao Laboratório de Polímeros da UFC pela disponibilização de equipamentos para as análises químicas e aos alunos Venícios Sombra e Náatalia Pires pela ajuda na realização e discussão de resultados.

À minha família, e minha namorada Thaís de Oliveira, por todo o apoio prestado ao longo desses anos de doutorado, em que estiveram incentivando e apoiando toda a minha trajetória acadêmica.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

O polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Gracilaria intermedia* (PGi) foi extraído por hidrólise enzimática e submetido a modificações estruturais de hidrólise e sulfatação química. Estes polissacarídeos foram submetidos a testes de composição química, com PGi apresentando baixo grau de substituição de sulfato e alta massa molar. A hidrólise foi capaz em reduzir a massa molar e a caracterização estrutural através da ressonância magnética nuclear de HSQC revelou que o PGi é uma agarana sulfatada com grupos substituintes de ácido pirúvico. O comportamento reológico foi avaliado usando diferentes concentrações de PGi. A resposta predominantemente viscosa e um comportamento reológico pseudoplástico do polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Gracilaria intermedia* sugere um potencial uso deste polímero como agente espessante. Avaliou-se também o efeito do polissacarídeo nativo, sulfatado e hidrolisado na coagulação através dos testes de tempop de tromboplastina parcialmente ativada (ATTP) e tempo de protrombina (TP), onde PGi, HPGi e SPGi apresentaram leve efeito sobre a via intrínseca da cascata de coagulação. A atividade antioxidante in vitro dos polissacarídeos foi também testada para capacidade antioxidante total, sequestro do radical hidroxila e quelação do íon ferroso. A melhor atividade na capacidade antioxidante total foi alcançada na concentração de 4 mg/mL para todas as formas do polissacarídeo, apresentando boa atividade antioxidante, o que mostra um potencial para ser usado especialmente para aplicação na indústria alimentícia, além de ser um substituto para compostos tóxicos como BHT e BHA. Avaliou-se também, a toxicidade do PGi através do teste do MTT, onde o polissacarídeo demonstrou não ser tóxico nas concentrações utilizadas. Também foi avaliada a atividade cicatrizante de um gel composto por PGi e galactomanana extraída de *Caesalpinia pulcherrima* em modelo de feridas limpas induzidas em camundongos. O gel formado ($G' > G''$) apresentou propriedades elásticas em diferentes temperaturas e comportamento de gel fraco e no teste cicatrizante, o gel apresentou a capacidade de acelerar a cicatrização no período entre três e sete dias de tratamento.

Palavras-chave: *Gracilaria intermedia*. Gelificante. Antioxidante. Cicatrizante.

ABSTRACT

The sulfated polysaccharide of the red seaweed *Gracilaria intermedia* (PGi) was extracted by enzymatic hydrolysis and subjected to hydrolysis and chemical sulfation changes. These polysaccharides were submitted to chemical composition tests, and PGi showed with low sulfate substitution and high molar mass. Hydrolysis was able to reduce the molar mass and structural characterization by HSQC nuclear magnetic resonance revealed that PGi is a sulfated agaran with pyruvic acid substituent groups. Rheological behavior was evaluated using different PGi concentrations. The predominantly viscous response and pseudoplastic rheological behavior of the sulphated polysaccharide extracted from *Gracilaria intermedia* suggests a potential use of this polymer as a thickening agent. The effect of native, sulphated and hydrolyzed polysaccharide in coagulation is was evaluated through activated partial thromboplastin time (ATTP) and prothrombin time (TP) tests, where PGi, HPGi and SPG have the same level of impact on the intrinsic. coagulation cascade. The in vitro antioxidant activity of polysaccharides was also tested for total antioxidant capacity, radical hydroxyl scavenging and ferrous ion chelation. The best activity in total antioxidant capacity was achieved at a concentration of 4 mg/mL for all polysaccharide forms, showing a good antioxidant activity and a potential to be used in food industry, besides being a substitute for toxic compounds like BHT and BHA. PGi toxicity was also evaluated through the MTT test, where the polysaccharide proved not to be toxic in the concentrations used. The wound healing activity of a gel composed of PGi and galactomannan extracted from *Caesalpinia pulcherrima* in the clean wound model in mice was also evaluated. The formed gel ($G' > G''$) exhibits elastic characteristics at different temperatures and the behavior of a weak gel and in the wound healing test, the gel shows the ability to accelerate healing within three to seven days of treatment.

Keywords: *Gracilaria intermedia*. Gelling. Antioxidant. Wound Healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Porcentagem de algas marinhas produzidas por aquacultura por espécies de algas e países no ano de 2014	16
Figura 2 - Representação esquemática estrutural das galactanas sulfatadas de algas vermelhas	18
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura química da agarana: agarose (1) e agarpectina (2)	19
Figura 4 - Classificação do comportamento reológico dos fluidos	22
Figura 5 - Curvas de fluxo e viscosidade de fluidos de comportamento newtoniano e não-newtoniano	23
Figura 6 - Representação esquemática de uma rede de polissacarídeo com cadeias dispostas aleatoriamente (esquerda) e uma rede de um gel de agarose comercial (direita)*	25
Figura 7 - Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha <i>Gracilaria intermedia</i> e sua classificação taxonômica	28
Figura 8 - Esquema de extração do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha <i>Gracilaria intermedia</i>	30
Figura 9 - Composição monossacarídica de PGI	37
Figura 10 - Cromatografia de permeação em gel de PGI nativo	40
Figura 11 - Cromatografia de permeação em gel de HPGI	41
Figura 12 - Ressonância Magnética Nuclear HSQC do PGI nativo	43
Figura 13 - Ressonância Magnética Nuclear HSQC de SPGI	44
Figura 14 - Curvas de cisalhamento do PGI em diferentes concentrações	45
Figura 15 - Representação esquemática da estabilização do radical livre	49
Figura 16 - Representação esquemática da peroxidação lipídica	50
Figura 17 - Esquema da cascata da coagulação com a divisão do sistema de coagulação em duas vias	55
Figura 18 - Representação esquemática da via extrínseca do sistema de coagulação sanguínea	56
Figura 19 - Representação esquemática da via intrínseca do sistema de coagulação sanguínea	57
Figura 20 - Efeito de PGI nativo na coagulação avaliado pelo teste do TTPA	64

Figura 21 - Efeito de SPGi na coagulação avaliado pelo teste do TTPA	65
Figura 22 - Efeito de HPGi na coagulação avaliado pelo teste do TTPA	65
Figura 23 - Capacidade antioxidante total do PGI nativo	68
Figura 24 - Capacidade antioxidante total do HPGi	69
Figura 25 - Capacidade antioxidante total do SPGi	69
Figura 26 - Habilidade de quelação do íon ferroso do PGI nativo	71
Figura 27 - Habilidade de quelação do íon ferroso do HPGi	71
Figura 28 - Habilidade de quelação do íon ferroso do SPGi	72
Figura 29 - Efeito no sequestro do radical DPPH do PGI nativo	73
Figura 30 - Efeito no sequestro do radical DPPH do PGI hidrolisado	73
Figura 31 - Efeito no sequestro do radical DPPH do PGI sulfatado	74
Figura 32 - Resultado do levantamento de patentes depositadas no WIPO classificadas em relação ao país de origem	85
Figura 33 - Resultado do levantamento de patentes depositadas no Espacenet classificadas em relação ao país de origem	86
Figura 34 - Resultado do levantamento de patentes depositadas na WIPO classificadas pelo ano de publicação	87
Figura 35 - Resultado do levantamento de patentes depositadas na Espacenet classificadas pelo ano de publicação	88
Figura 36 - Resultado do levantamento de patentes depositadas no WIPO classificadas pela Classificação Internacional de Patentes (CIP)	89
Figura 37 - Patentes depositadas no Espacenet classificadas pela Classificação Internacional de Patentes (CIP)	89
Figura 38 - Citotoxicidade de PGI em diferentes concentrações	91
Figura 39 - Atividade anti-inflamatória de PGI em diferentes concentrações	92
Figura 40 - Efeito do gel nos módulos de armazenamento e dissipação medidos pelo teste de varredura de frequência a 25°C e 37°C	93
Figura 41 - Avaliação da evolução das feridas após tratamento em lesões induzidas em camundongos	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas do gênero <i>Gracilaria</i>	34
Tabela 2 - Microanálise elementar do PGI nativo, supersulfatado e hidrolisado	38
Tabela 3 - Assinalamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do PGI nativo ..	43
Tabela 4 - Parâmetros do comportamento reológico de PGI, HPGi e SPGi	46
Tabela 5 - Efeito dos tratamentos na evolução das áreas das lesões induzidas em camundongos	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA	Butilado de hidroxianisol
BHT	Butilado de hidroxitolueno
BSA	Albumina sérica bovina
CAP	Capacidade antioxidante total
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
CFTR	Regulador de condutância transmembranar de fibrose cística
CPG	Cromatografia de permeação em gel
D ₂ O	Água deuterada
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Ferrozina	Ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p-p'-disulfônico
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infra-vermelho
G	β -D-galactose
G'	módulos de armazenamento
G''	módulos de dissipação
GS	Grau de substituição de sulfatação
HPGi	Polissacarídeo da alga <i>Gracilaria intermedia</i> hidrolisado
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
LA	3,6- α -L-anidrogalactose
MeOH	Metanol
MpK	Pico de massa molar
OMS	Organização mundial de saúde
PGi	Polissacarídeo de <i>Gracilaria intermedia</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PL	Peroxidação lipídica
PLS	Polissacarídeos sulfatados
RMN	Ressonância magnética nuclear
SPGi	Polissacarídeo de <i>Gracilaria intermedia</i> sulfatado quimicamente
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	CAPITULO I: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL E REOLOGIA DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DE <i>Gracilaria intermedia</i> MODIFICADO ESTRUTURALMENTE	14
1.1	Introdução	14
1.1.1	<i>Algas marinhas</i>	14
1.1.2	<i>Importância econômica das algas</i>	15
1.1.3	<i>Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas</i>	16
1.1.4	<i>Galactanas sulfatadas</i>	18
1.1.5	<i>Caracterização estrutural das agaranas</i>	19
1.1.6	<i>Modificações estruturais</i>	20
1.1.7	<i>Reologia</i>	21
1.1.8	<i>Comportamento reológico das agaranas</i>	24
1.1.9	<i>Gracilaria intermedia</i>	26
1.2	Objetivos	27
1.2.1	<i>Objetivo geral</i>	27
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	27
1.3	Materiais e métodos	28
1.3.1	<i>Coleta e identificação da alga marinha</i>	29
1.3.2	<i>Extração do polissacarídeo sulfatado (PGi)</i>	29
1.3.3	<i>Determinação do teor de carboidratos</i>	31
1.3.4	<i>Determinação do teor de proteínas contaminantes</i>	31
1.3.5	<i>Composição monossacarídica</i>	31
1.3.6	<i>Sulfatação química</i>	32
1.3.7	<i>Hidrólise enzimática</i>	32
1.3.8	<i>Determinação do teor de sulfato, hidrogênio e carbono</i>	32
1.3.9	<i>Determinação da massa molar média por cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	32
1.3.10	<i>Caracterização químico-estrutural por ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	33
1.3.11	<i>Propriedades reológicas</i>	33
1.4	Resultados e discussão	34

1.4.1	<i>Rendimento da extração</i>	34
1.4.2	<i>Teor de carboidratos totais e proteínas</i>	35
1.4.3	<i>Composição monossacarídica</i>	36
1.4.4	<i>Microanálise elementar e rendimento das modificações químicas</i>	37
1.4.5	<i>Peso Molecular de PGI</i>	38
1.4.6	<i>Caracterização químico-estrutural por ressonância magnética nuclear</i>	41
1.4.7	<i>Comportamento reológico</i>	44
1.5	Conclusão	48
2	CAPITULO II: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COAGULANTE DO POLISSACARÍDEO DE <i>Gracilaria intermedia</i> COM MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS	49
2.1	Introdução	49
2.1.1	<i>Estresse oxidativo</i>	49
2.1.2	<i>Antioxidantes naturais e sintéticos</i>	51
2.1.3	<i>Efeito antioxidante das galactanas de algas marinhas</i>	52
2.1.4	<i>Hemostasia e coagulação sanguínea</i>	53
2.1.5	<i>Efeito dos polissacarídeos sulfatados na coagulação</i>	57
2.2	Objetivos	59
2.2.1	<i>Objetivo geral</i>	59
2.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	59
2.3	Materiais e métodos	60
2.3.1	<i>Capacidade antioxidante total</i>	60
2.3.2	<i>Habilidade de quelação do íon ferroso</i>	60
2.3.3	<i>Sequestro do radical DPPH</i>	60
2.3.4	<i>Plasma humano</i>	61
2.3.5	<i>Aspectos éticos e legais</i>	61
2.3.6	<i>Tempo de tromboplastina parcialmente ativada</i>	61
2.3.7	<i>Tempo de protrombina</i>	62
2.3.8	<i>Análises estatísticas</i>	62
2.4	Resultados e discussão	63
2.4.1	<i>Tempo de tromboplastina parcialmente ativada</i>	63
2.4.2	<i>Tempo de protrombina</i>	66
2.4.3	<i>Capacidade antioxidante total</i>	66

2.4.4	<i>Habilidade de quelação do íon ferroso</i>	70
2.4.5	<i>Sequestro do radical DPPH</i>	72
2.5	Conclusão	75
3	CAPITULO III: EFEITO ANTIDIARREICO DO POLISSACARIDEO SULFATADO ISOLADO DA ALGA MARINHA VERMELHA <i>Gelidium coarctatum</i> (GcP)	76
3.1	Introdução	76
3.1.1	<i>Tratamento de feridas cutâneas</i>	76
3.1.2	<i>Curativos modernos</i>	76
3.1.3	<i>Hidrogéis</i>	77
3.1.4	<i>Cicatrização</i>	78
3.2	Objetivos	80
3.2.1	<i>Objetivo geral</i>	80
3.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	80
3.3	Materiais e métodos	81
3.3.1	<i>Prospecção de patentes</i>	81
3.3.2	<i>Isolamento de polimorfonucleares</i>	81
3.3.3	<i>Avaliação da citotoxicidade</i>	81
3.3.4	<i>Avaliação da Atividade Anti-inflamatória</i>	82
3.3.5	<i>Formulação do hidrogel cicatrizante</i>	82
3.3.6	<i>Propriedades reológicas do gel</i>	83
3.3.7	<i>Atividade cicatrizante</i>	83
3.3.8	<i>Aplicação do gel em feridas limpas induzidas em camundongos</i>	84
3.3.9	<i>Análise macroscópica das feridas</i>	84
3.3.10	<i>Aplicação do gel em feridas limpas induzidas em camundongos</i>	84
3.4	Resultados e discussão	85
3.4.1	<i>Prospecção de patentes por país de origem</i>	85
3.4.2	<i>Prospecção de patentes por ano de publicação</i>	86
3.4.3	<i>Classificação Internacional de Patentes (CIP)</i>	88
3.4.4	<i>Teste do MTT</i>	90
3.4.5	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória</i>	91
3.4.6	<i>Módulo G' e G'' do gel</i>	92
3.4.7	<i>Avaliação macroscópica das feridas</i>	94

3.5	Conclusão	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A – ARTIGOS	111

1 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL E REOLOGIA DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO *Gracilaria intermedia* MODIFICADO ESTRUTURALMENTE

1.1 Introdução

1.1.1 Algas marinhas

As algas marinhas compõem um grupo de organismos eucariotos, autotróficos e fotossintéticos. Estes organismos apresentam uma grande importância ecológica, pois são responsáveis pela liberação de grande parte do oxigênio presente na atmosfera terrestre e têm a função de servir como base da cadeia alimentar de ambientes aquáticos, como lagos e mares (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Apesar de apresentarem algumas características ecológicas em comum, as algas têm características morfológicas, estruturais e metabólicas bastante diversificadas. Na verdade, o nome ‘alga’ é um termo genérico utilizado para agrupar um conjunto de seres vivos com características semelhantes, como o fato de possuírem clorofila e talo não diferenciado em raiz, caule e folha. Entretanto, os organismos presentes neste grupo não possuem um ancestral comum, constituindo assim um grupo polifilético (BHATTACHARYA; MEDLIN, 1998; OLIVEIRA, 2003). Tradicionalmente, as algas são classificadas em relação a sua morfologia em microalgas (unicelulares) ou macroalgas (multicelulares). As macroalgas, por sua vez, podem ser classificadas de acordo com suas características bioquímicas, citológicas e morfológicas em três grandes grupos principais: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Com os avanços mais recentes na área da biologia molecular, especialmente através da utilização do sequenciamento do DNA do cloroplasto e do RNA ribossomal, os taxonomistas puderam refinar a classificação taxonômica das algas. Atualmente, a nova classificação compreende os grupos Cyanophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Phaeophyta, Dinophyta, Haptophyta, Chlorophyta, Charophyta e Euglenophyta (PEREIRA; NETO, 2014).

Dentre estes grupos de algas marinhas, as algas vermelhas apresentam uma grande diversidade de espécies: entre 4.000 e 6.000 e várias destas estão distribuídas na costa atlântica brasileira devido à sua preferência por águas de temperatura quente. Em sua maioria são macroalgas, variando de poucos centímetros até cerca de um metro de comprimento, com formas cilíndricas compridas ou foliáceas. Essas algas não necessariamente precisam ser

vermelhas, podendo se apresentar com tonalidades acastanhadas ou mesmo roxas (MCHUGH,2003; TEIXEIRA, 2012; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

As algas desenvolveram diversas estratégias evolutivas para se adaptar às diversas condições ambientais presentes nos ambientes aquáticos, como baixas concentrações de nutrientes, altas pressões, alta salinidade, baixa oxigenação e luminosidade, competição por espaço e predação. Essas pressões possibilitam o desenvolvimento de estratégias de adaptação únicas, como a produção de diversas biomoléculas com potenciais bioativos a partir de diferentes vias metabólicas (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003).

As algas vermelhas apresentam diversas biomoléculas que atraem a atenção de vários grupos de pesquisa como fonte potencial de compostos biologicamente ativos (MAYER *et al.*, 2017). Foi demonstrado que vários compostos extraídos de diferentes espécies, como lectinas, lipídios e polissacarídeos sulfatados, exibem propriedades farmacológicas, como antioxidante (ALENCAR *et al.*, 2019), anti-inflamatório (HE *et al.*, 2014), antinociceptivo (COURA *et al.*, 2017) e atividades gastroprotetoras (SOUSA *et al.*, 2016).

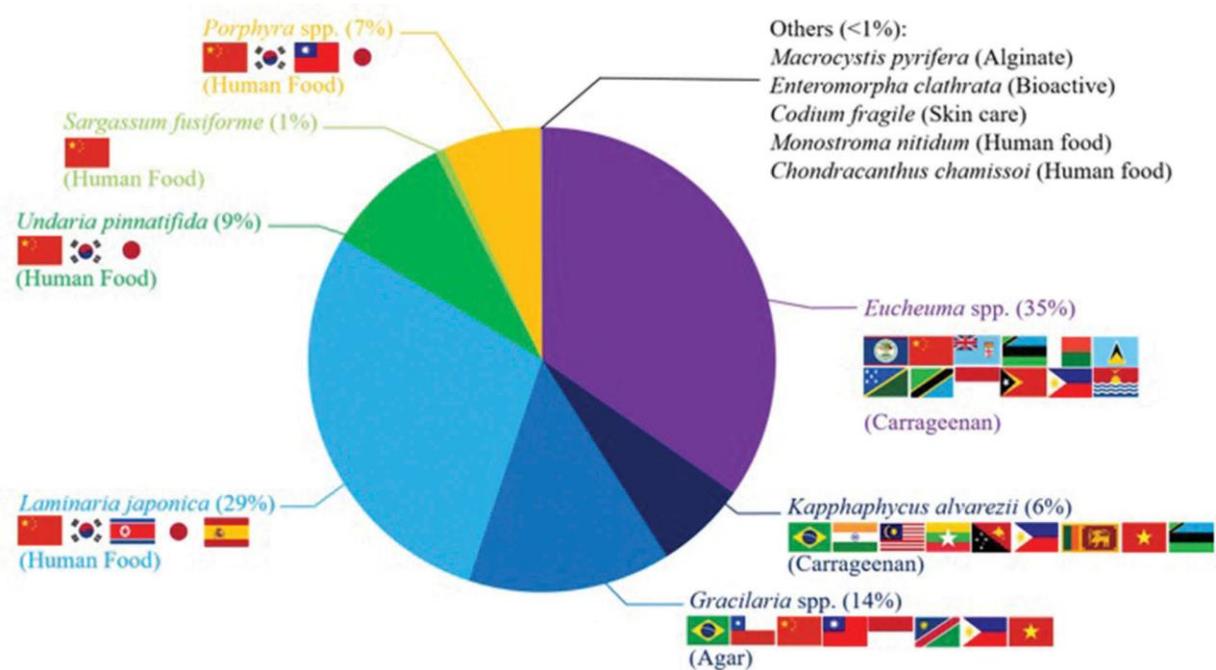
1.1.2 Importância econômica das algas marinhas

Atualmente, a maior parte da produção de algas no mundo tem como finalidade a extração de hidrocolóides (alginatos, ágar e carragenanas) para serem utilizados como aditivos alimentares (PORSE, 2017). No mundo, a venda de hidrocolóides em 2013 foi superior a 100.000 toneladas no valor de aproximadamente 1,2 bilhões de dólares, apresentando um crescimento de mercado internacional anual de 2% (YARISH *et al.*, 2016). Dentre os hidrocolóides, o ágar é um dos mais utilizados por ser um polímero com a característica de formar géis a temperatura ambiente, o que é extremamente importante para o processamento industrial (PORSE, 2017). A produção global de ágar passou de 9.600 toneladas (173 milhões de dólares) em 2009 para 14.500 toneladas (246 milhões de dólares) em 2015, com espécies dos gêneros *Gracilaria* (80%) e *Gelidium* (20%) como maiores fontes industriais (PORSE, 2017). Além disso, as algas podem ser utilizadas como alimento (BARBA, 2017), complemento de ração animal (GARCIA-VAQUERO *et al.*, 2016), produção de substâncias químicas (VAN DE WAL *et al.*, 2013; WEI; QUARTEMAN; JIN, 2013), produção de bioenergia (GHADIRYANFAR *et al.*, 2016) entre outros.

Devido à esta importância econômica, o cultivo de algas favorece o desenvolvimento socioeconômico local e tem como vantagem o uso de tecnologias relativamente simples, requerendo baixo capital de investimento inicial. Além disso, as culturas podem ser colhidas

em pouco tempo, o que representa um retorno rápido para o investimento (FERDOUSE *et al.*, 2018). A figura 1.1 mostra a porcentagem de algas produzidas por aquacultura por espécies de algas e seus respectivos países.

Figura 1 - Porcentagem de algas marinhas produzidas por aquacultura por espécies de algas e países no ano de 2014.



Fonte: FAO, 2016.

No Brasil as algas vermelhas são as mais cultivadas, destacando-se o cultivo de espécies de *Gracilaria*. A maior parte do agar produzido por essas algas são exportadas e apenas uma pequena parte da produção é utilizada pelas indústrias brasileiras. Na costa nordestina, destaca-se o cultivo de *Gracilaria cornea* e *Gracilaria caudata* para extração e exportação do ágar, enquanto que as espécies do gênero *Hypnea*, especialmente *Hypnea musciformis*, são utilizadas para produção de carragenana, que também possui grande valor econômico (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

1.1.3 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

Devido às flutuações de umidade, temperatura, salinidade e intensidade luminosa do meio em que vivem, as algas marinhas apresentam uma diversidade estrutural bastante

complexa (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014). Em decorrência disto, a parede celular das macroalgas é bastante resistente, composta por uma fração fibrilar rica em celulose formada por repetições de D-glucose que confere resistência, e outra fração amorfa rica em polissacarídeos sulfatados que conferem flexibilidade (HOEK *et al.*, 1995; NELSON; COX, 2018).

Esta fração amorfa é composta por um componente mucilaginoso, que varia em sua composição de acordo com a classificação das algas. Nas algas vermelhas este material amorfo se encontra na forma de polissacarídeos sulfatados constituídos por repetições de D-galactose, denominados de galactanas sulfatadas devido à presença de ésteres de sulfato em sua cadeia carbônica (CRAIGIE, 1990). As algas pardas (Phaeophyta) possuem alginatos e fucanas, enquanto que as algas verdes (Chlorophyta) apresentam polissacarídeos mais complexos, formados por resíduos de monossacarídeos diferentes: D-galactose, D-xilose, L-ramnose, L-arabinose e ácido D-glucurônico (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967; PAINTER, 1983).

Os polissacarídeos sulfatados (PLS) de algas marinhas vermelhas são macromoléculas polianiónicas complexas formadas por unidades repetitivas principalmente de D-galactose. Dentre os grupos substituintes das hidroxilas presentes, os grupamentos sulfatos são os mais frequentes, conferindo diversidade estrutural e propriedades biológicas diversificadas para cada espécie de alga (ROCHA; LAHAYE; YAPHE, 1986; USOV; 1998; JIAO *et al.*, 2011). Além da flexibilidade na parede celular, pouco se sabe sobre outras funções desempenhadas pelos PLS nas algas, porém, sugere-se que uma das suas funções seja a proteção contra desidratação em condições de maré baixa através da regulação osmótica e iônica, o que explica o fato de que algas que são encontradas na zona entremarés apresentam maior teor de PLS (KLOAREG; QUATRANO, 1988; MICHEL *et al.*, 2010).

A diversidade estrutural dos polissacarídeos proporciona a essas moléculas diversas propriedades, que são um dos fatores cruciais para o interesse em relação ao estudo de algas marinhas. Vários grupos de pesquisas utilizam esses polissacarídeos na busca de novas fontes de biomoléculas com atividade biológica, como: antiinflamatória (CUI *et al.*, 2019), antinociceptiva (BHATIA *et al.*, 2019), anticoagulante (MENDES MARQUES *et al.*, 2019), gastroprotetora (LAJILI *et al.*, 2019), antidiarreica (LIU *et al.*, 2019), antioxidante (ALENCAR *et al.*, 2019), anticancerígena (CHEN *et al.*, 2019), dentre outras. Enquanto que várias indústrias utilizam os PLS como hidrocolóides, aplicados como espessantes, gelificantes, estabilizantes de espumas, emulsões, inibidores de formação de cristais de açúcar, liberação controlada de aromas, dentre outras (WILLIAMS; PHILLIPS, 2009;

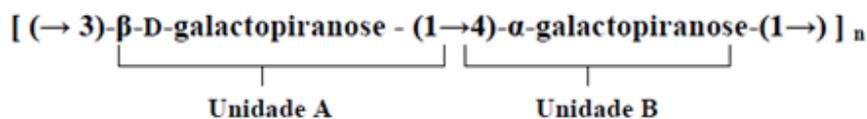
PORSE, 2017).

1.1.4 Galactanas sulfatadas

O estudo detalhado da estrutura química dos polissacarídeos sulfatados é importante para correlacionar funções químicas presentes em seus esqueletos carbônicos, como padrões de sulfatação, substituições das cadeias laterais e ocorrência de grupamentos metílicos ou açúcares anidros, com propriedades físico-químicas e/ou potencial biológico (USOV; BILAN, 2009; PEREIRA *et al.*, 2005; QUINDERÉ *et al.*, 2014). Parece haver uma estreita correlação entre sua estrutura principal, composição de monossacarídeos, substituições de sulfato e a taxa em que são encontradas (COSTA *et al.*, 2010)

As galactanas sulfatadas compartilham uma cadeia linear básica comum constituída por repetições de dissacarídeos $[(AB)_n]$, onde a unidade A é composta por β (1 \rightarrow 3) D-galactopiranosose e a unidade B por α (1 \rightarrow 4) D- ou L- galactopiranosose, possuindo grupos sulfatos ao longo da cadeia linear (Figura 1.2). Algumas unidades de α -galactopiranosose podem se apresentar na forma cíclica 3,6- α - anidrogallactopiranosose (PAINTER, 1983; ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; LAHAYE, 2001). As galactanas podem apresentar também substituições de seus grupos hidroxilas por grupamentos metil, piruvato, sulfato e monossacarídeos adicionais (USOV, 1998).

Figura 2 - Representação esquemática estrutural das galactanas sulfatadas de algas vermelhas.



Fonte: Campo *et al.*, (2009).

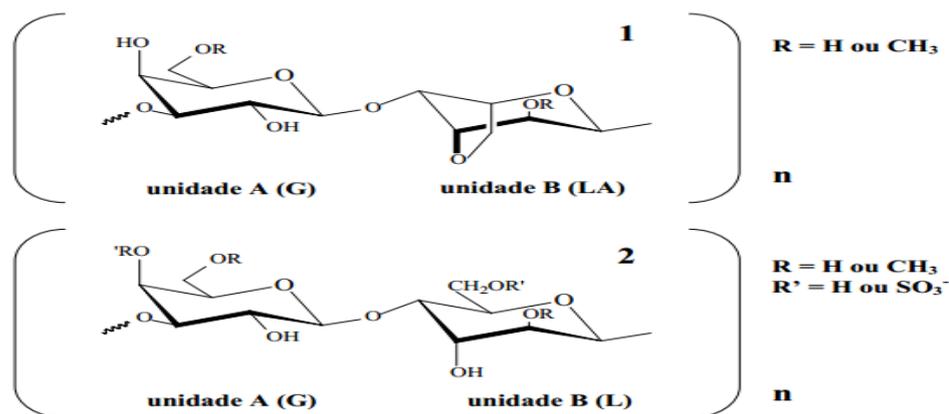
As galactanas sulfatadas são divididas em dois grupos principais: as agaranas e as carragenanas (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Essa divisão baseia-se na estereoquímica da unidade B do polímero: se esta unidade pertence à série D, a galactana é considerada uma carragenana, se a unidade pertence à série L, é caracterizada como agarana (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; USOV, 1998; CAMPO *et al.*, 2009). Também há um terceiro tipo galactana sulfatada, que apresenta na unidade B ambas formas enantioméricas, conhecida como híbrido de galactana (STORTZ; CEREZO, 2002).

As galactanas sulfatadas podem ser utilizadas em diversas aplicações industriais, tais como: produção de géis e espessantes para alimentos (CASTRO *et al.*, 2018), produção de matrizes de testes de toxicidade de cosméticos (LEE *et al.*, 2019) e produção de biocombustíveis (SILLER-SANCHEZ *et al.*, 2019). Também é possível associá-las a propriedades biológicas, como: nefroprotetora (JABALLI *et al.*, 2019), antioxidante (ALENCAR *et al.*, 2019), anti-inflamatória (CUI *et al.*, 2019), anti-amiloidogênica (OLASEHINDE *et al.*, 2019), gastroprotetora (LAJILI *et al.*, 2019), antidiarreica (BEZERRA *et al.*, 2018), dentre outras. Além destas propriedades, as mesmas geralmente possuem baixa toxicidade, o que é uma característica bastante importante para utilização no consumo humano (YANG; ZHANG, 2009; YU *et al.*, 2018).

1.1.5 Caracterização estrutural das agaranas

As algas marinhas vermelhas do gênero *Gracilaria* têm como característica a presença de ágar como galactana sulfatada mais abundante (ARMISEN, GAIATAS, 1987; MARINHO-SORIANO, 2001). As agaranas são constituídas de uma mistura de agarose (unidades neutras de galactose) e agarpectina (unidades aniônicas de galactose), representadas na figura 1.3.

Figura 3 - Representação esquemática da estrutura química da agarana: agarose (1) e agarpectina (2).



Fonte: Barros *et al.*, (2013).

A agarose é composta essencialmente por uma estrutura linear de unidades repetitivas do dissacarídeo (1→3)-β-D-galactose (unidade A) e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactose (unidade B). Essa fração neutra pode apresentar substituições de hidroxilas por resíduos de monossacarídeos como 6-O-metil-D-galactose, L-galactose ou 2-O-metil-L-galactose

(ARMISEN; GAIATAS, 1987; PHILLIPS; WILLIAMS, 2009). A agaropectina, por sua vez, é composta por (1→3)-β-D-galactose (unidade A) e (1→4)-α-L-galactose (unidade B) com a presença de substituições de ésteres de sulfato, ácido pirúvico, ácido D-glucorônico e/ou grupamentos metil (MARINHO-SORIANO, BOURRET, 2005; BARROS *et al.*, 2013). Esses substituintes podem estar localizados em diferentes combinações e/ou posições ao longo da cadeia linear do polímero, assegurando assim a variação químico-estrutural dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas (ARMISEN; GAIATAS, 1987; LAHAYE, 2001).

Apesar da estrutura linear do esqueleto das galactanas ser preservada entre os grupos de algas, a estrutura química desses biopolímeros varia entre as espécies. O padrão de sulfatação (quantidade e posição na cadeia), peso molecular, quantidade de 3,6-anidro-α-galactopirranose e outros grupos substituintes alteram as propriedades físico-químicas, comportamento reológico e atividades biológicas das galactanas (WANG, 2018; POMIN; MOURÃO, 2008; POMIN, 2010; MELO *et al.*, 2002). Dessa maneira, o estudo químico-estrutural das agaranas é importante para conseguir realizar uma associação com propriedades importantes desses polímeros.

O ágar tem como característica importante o fato de ser gelatinoso em temperatura ambiente devido às suas propriedades reológicas e por esse motivo tem sido bastante explorado economicamente em vários ramos industriais, como: cosméticos, biotecnológico, farmacêutico e principalmente alimentício (ARMISEN, 1995; LEE *et al.*, 2017). A diversidade estrutural e os enantiômeros D e L de galactose fazem com que o ágar apresente suas propriedades gelificantes (LI *et al.*, 2008).

1.1.6 Modificações estruturais

A modificação da estrutura de polissacarídeos sulfatados, como dessulfatação, sulfatação química, acetilação e benzoilação, permite o desenvolvimento de novos e possivelmente mais efetivos derivativos de polissacarídeos de ocorrência natural (WANG *et al.*, 2018). Uma modificação estrutural dos PLS que é bastante realizada é a sulfatação química, devido à forte correlação entre o conteúdo de sulfato e atividade biológica. Vários métodos foram desenvolvidos para a sulfatação química de polissacarídeos, como o tratamento com ácido sulfúrico, trióxido de enxofre-piridina, ácido clorossulfônico-piridina, dimetilformamida e enxofre trióxido-dimetilamina (BHATTACHARYYA *et al.*, 2010; QI *et al.* 2005) Também demonstrou-se que a atividade anticoagulante de fucanos de algas depende

de seu peso molecular, da extensão da sulfatação e da distribuição dos grupos sulfato nas unidades de repetição (WANG, *et al.* 2018).

Outra modificação estrutural bastante utilizada em polissacarídeos sulfatados é a hidrólise. PLS de algas de menor peso molecular podem ser preparados por processos químicos, físicos ou meios enzimáticos para obter oligossacarídeos com bioatividades mais diversas. Por exemplo, galactanas lineares sulfatados podem ser clivados por hidrólise ácida (SUN *et al.*, 2010) ou por um processo que envolve o sistema redox de peróxido de hidrogênio e cobre (NARDELLA *et al.*, 1996). Estes métodos químicos são de fácil execução, mas apresentam baixa especificidade. Pequenas alterações de temperatura ou acidez podem levar a variações no tamanhos de oligossacarídeos e padrões de sulfatação, enquanto que um ácido forte pode alterar o padrão de sulfatação ou destruir a cadeia de polissacarídeos (HOLTKAMP *et al.*, 2009). Uma forma mais específica de degradação de PLS é a enzimática, que pode ser alcançada por seleção de enzimas como galactosidases para atingir ligações glicosídicas específicas enquanto preserva os grupos sulfato (MICHEL *et al.*, 2006).

Apesar de se saber que modificações estruturais alteram as atividades biológicas e propriedades destas moléculas, esta relação entre a estrutura e atividades biológicas dos PLS de algas marinhas não é completamente compreendida. Uma das abordagens no estabelecimento de relações estrutura-função tem sido fazer inferências com base em informações obtidas de estudos de PLS de invertebrados marinhos, por estes serem mais facilmente estudados (WANG *et al.*, 2018).

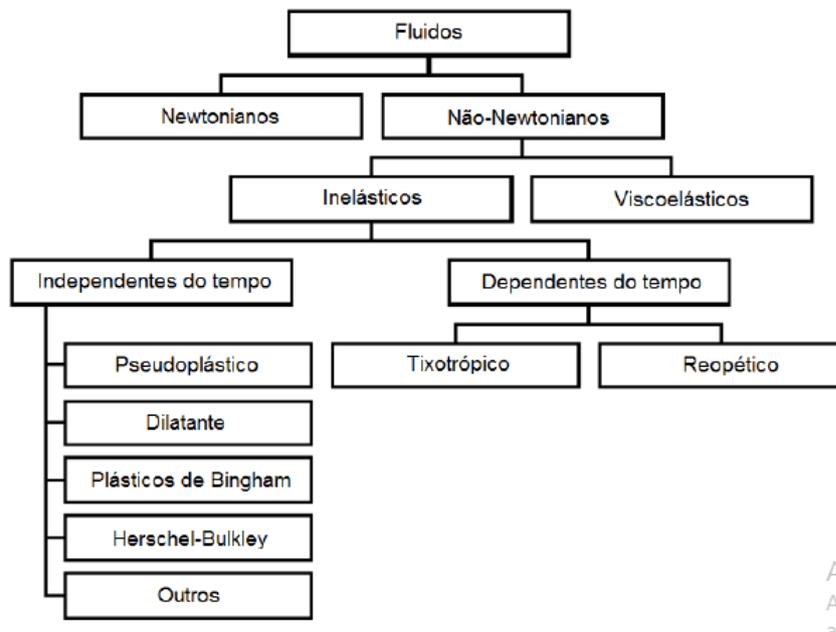
1.1.7 Reologia

Para avaliar o comportamento dos polissacarídeos sulfatados em estado de solução-gel, diversos métodos reológicos têm sido empregados. O comportamento reológico dos polímeros é determinado por medidas de força e deformação externa em função do tempo e experimentos de reologia são bastante utilizados para classificar estes materiais (TOLEDO; SINGH; KONG, 2007; MUNIZAGA; CANOVÁ, 2005). Dentre os experimentos mais utilizados para classificação dos materiais, as curvas de escoamento são bastante úteis e são utilizadas no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos (SCHUCK, 2018).

Em relação à sua classificação, os fluidos podem ser categorizados como materiais newtonianos e não-newtonianos (Figura 1.4). Esta subdivisão tem como base o comportamento da relação da taxa de deformação/tensão de cisalhamento do fluido, que pode ser visualizada em curvas de escoamento (Figura 1.5) (STEFFE, 1996). Os fluidos não-

newtonianos, por sua vez, podem ser subdivididos em viscoelásticos ou inelásticos, através da análise das curvas de fluxo do material. Os fluidos viscoelásticos apresentam características de materiais sólidos e elásticos, enquanto que as propriedades reológicas dos fluidos inelásticos podem se alterar de acordo com o tempo de aplicação das tensões de cisalhamento (SCHRAMM, 2006; CASTRO, 2014). O comportamento não-newtoniano pode ser caracterizado em um fluido pela análise da viscosidade do mesmo em relação à velocidade de deformação ou em relação ao tempo. Nessas situações a viscosidade deverá ser apresentada como viscosidade aparente para cada velocidade de deformação ou para cada tempo (MALKIN; ISAYEV, 2017).

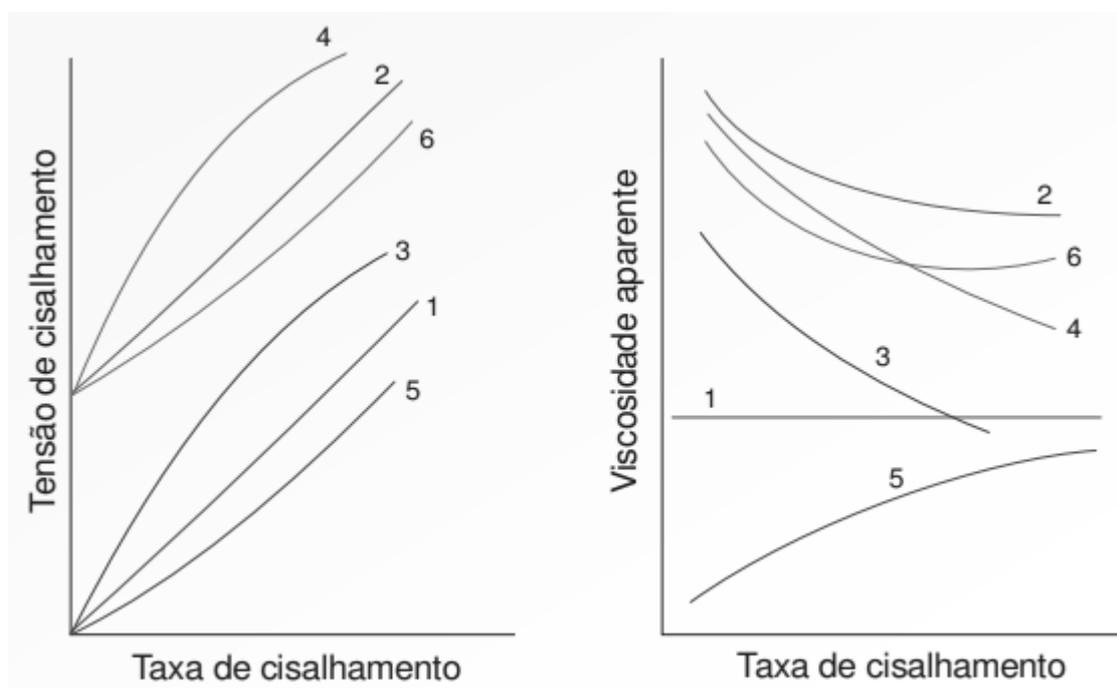
Figura 4 - Classificação do comportamento reológico dos fluidos.



Fonte: STEFFE (1996)

A tensão de cisalhamento é igual à viscosidade multiplicada pela taxa de cisalhamento, e refere-se à força aplicada tangencialmente sobre uma área. Quando um fluido é mantido entre duas placas, a superior móvel e a inferior estacionária, ao se aplicar uma força na placa superior, a velocidade do fluxo gerado é máxima na camada em contato com a placa superior (móvel) e decresce através das camadas adjacentes do fluido, até chegar à zero na camada ligada à placa estacionária, isso acontece devido à resistência interna do fluido, ou seja, sua viscosidade. A taxa de cisalhamento é caracterizada pela deformação das camadas líquidas do fluido e a velocidade com a qual a deformação aumenta em relação ao tempo (SCHRAMM, 2006).

Figura 5 – Curvas de fluxo e viscosidade de fluidos de comportamento newtoniano e não-newtoniano.



¹Fluido newtoniano. ²Fluido de Bingham. ³Fluido pseudoplástico. ⁴Fluido pseudoplástico com tensão de escoamento. ⁵Fluido dilatante. ⁶Fluido dilatante com tensão de escoamento. Fonte: adaptado SCHRAMM (2006).

Os polissacarídeos sulfatados das algas marinhas em solução geralmente formam fluidos não-newtonianos, inelásticos com comportamento reológico pseudoplástico (CASTRO *et al.*, 2018). Schramm (2006) define os fluidos pseudoplásticos como substâncias que em repouso, têm estado molecular desordenado, entretanto, quando são submetidos à tensão de cisalhamento, as moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. Então, quanto maior a tensão aplicada, maior será a ordenação das moléculas. Dessa maneira, quanto maior a tensão/taxa de cisalhamento sofrida pelo pseudoplástico, menor a viscosidade do mesmo. Isso significa que o fluido escoar mais facilmente conforme aumenta a velocidade de agitação das moléculas (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHOTT, 1992).

O uso de polissacarídeos sulfatados como espessantes e gelificantes está associado com a capacidade desses biopolímeros de aumentar a viscosidade de líquidos. A viscosidade é a propriedade de resistência interna que o fluido oferece a deformação por cisalhamentos e é influenciada diretamente pela temperatura (RAO, 2010). Os fluidos newtonianos possuem viscosidade constante quando submetidos a uma taxa de cisalhamento versus taxa de deformação, enquanto que os fluidos não-newtonianos não apresentam viscosidade constante (SCHRAMM, 2006).

Para avaliar o comportamento gelificante de polímeros são utilizados ensaios oscilatórios. Essas metodologias permitem avaliar a estabilidade das suspensões dos polímeros, fornecendo parâmetros correlacionados ao comportamento da estrutura do material, uma vez que são realizados em baixas taxas de deformação (STEFFE, 1996). Os ensaios oscilatórios permitem definir os módulos de armazenamento (G') e os módulos de dissipação (G''), obtidos em função da frequência (ω), produzindo um espectro mecânico (GIBOREAU; CUVELIER; LAUNAY, 1994). Esse espectro mecânico é realizado em duas etapas distintas e independentes: a varredura de tensão a varredura de frequência. A varredura de tensão registra os valores de G' e G'' que determinam a máxima tensão que pode ser aplicada ao material sem que ocorra a ruptura da sua estrutura interna. Enquanto que a varredura de frequência caracteriza a conformação e as interações intermoleculares dos materiais (SATO, CUNHA, 2007). Logo, G' indica a energia da força aplicada é temporariamente estocada (medida de elasticidade do polímero), enquanto que o G'' a energia utilizada para iniciar o fluxo é irreversivelmente perdida, pois é convertida em energia térmica e associa-se ao caráter líquido do polímero (NAÉ, 1993). A razão entre G' e G'' permite classificar a força dos géis em soluções diluídas, concentradas, gel fraco e gel forte (LAPASIN, 2012; BAO *et al.*, 2016).

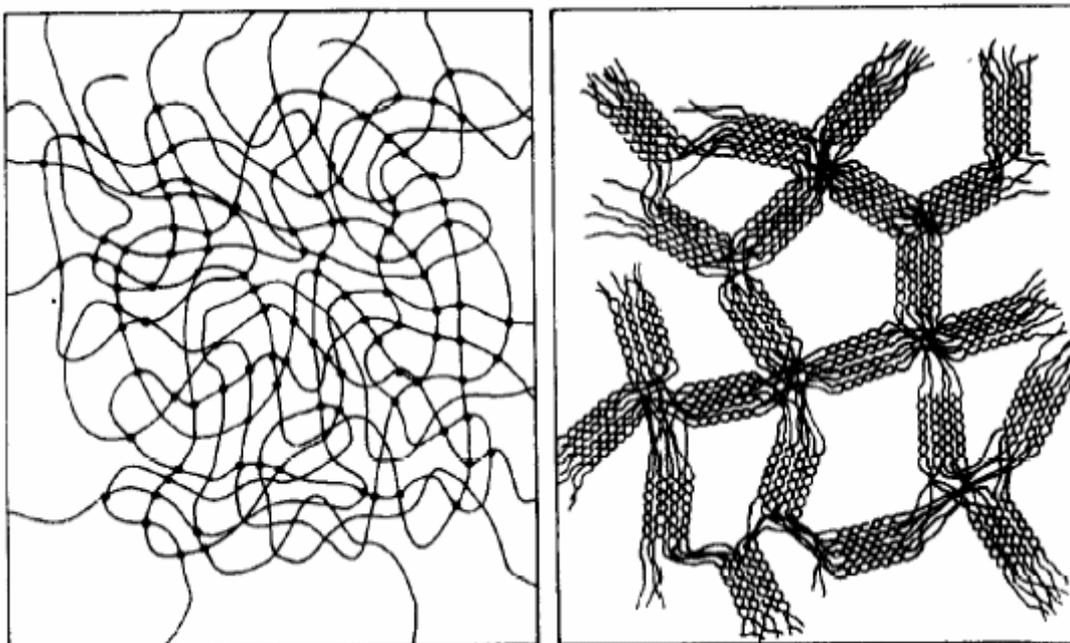
1.1.8 Comportamento reológico das agaranas

As agaranas são biopolímeros sulfatados, definidas como hidrocolóides por possuírem a capacidade de formarem géis termorreversíveis a baixas concentrações e em temperatura ambiente, o que faz com que esses polissacarídeos possuam elevado valor de mercado (PORSE, 2017; ARMISEN, 1995; LAHAYE, 2001). A capacidade gelificante do ágar devido ao fato da estrutura molecular da agarose manter uma formação helicoidal, produzindo uma rede reticulada capaz de reter moléculas de água no interstício do gel (Figura 1.6) (SCHAFER; STEVENS, 1995). As pontes de hidrogênio formadas entre os átomos de oxigênio do polímero com moléculas de água são responsáveis pela estabilização da estrutura do gel (LAHAYE; ROCHA, 1991).

A produção e o comportamento das redes tridimensionais formadas pelas agaranas são baseadas na auto-associação da estrutura primária desses polissacarídeos. Essa associação promove a formação de grandes agregados que se dissociam apenas em temperaturas elevadas (LAHAYE, 2001). Logo, a estrutura primária das agaranas é correlacionada diretamente com o comportamento reológico desses polímeros, principalmente em relação à variação de teor de

sulfato, peso molecular e quantidade de 3,6-anidro- α -galactopiranosose encontrados em diferentes espécies de algas vermelhas (BIRD; HANISAK; RYTHER, 1981; SOUZA *et al.*, 2012; RHEIN-KUDSEN *et al.*, 2017).

Figura 6 – Representação esquemática de uma rede de polissacarídeo com cadeias dispostas aleatoriamente (esquerda) e uma rede de um gel de agarose comercial (direita)*.



*O número de hélices pode conter de 10 a 10.000 unidades.

Fonte: DEA (1993).

Outro fator importante para a formação das redes tridimensionais, é que as agaranas são influenciadas pelos grupos carregados que participam das ligações intermoleculares das pontes de hidrogênio (MURANO, 1995; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 1997). Logo, quanto menor o grau de sulfatação da agarana, maior é a capacidade gelificante desse polímero (COSSON *et al.*, 1995). Além disso, a alteração da força iônica através da inserção de cátions em altas concentrações dificulta a formação da rede tridimensional do gel (WATASE; NISHINARI, 1982).

Lapasin & Priel (2013) demonstraram a importância e aplicabilidade dos polissacarídeos naturais nas indústrias alimentícias. Esses polímeros são utilizados principalmente por questões tecnológicas como estabilizantes de emulsões e suspensões, ou até mesmo para fornecer estrutura física necessária para o empacotamento e distribuição. Entretanto, o maior consumo por parte das indústrias é justificado pela sua capacidade de

espessar e gelificar soluções, processos importantes para melhorar aceitação dos produtos por parte dos consumidores.

1.1.9 Gracilaria intermedia

Gracilaria intermedia é uma espécie de alga vermelha, encontrada em águas quentes, membro da família Gracilariaceae, que inclui algumas das mais importantes algas produtoras de agar (OLIVEIRA, ALVEAL, & ANDERSON, 2000). Esta espécie já possui diversas atividades relatadas, como antioxidante e antidiarreica (CASTRO, 2018; LEÓDIDO, 2017). As famílias *Gelidiaceae* e *Gracilariaceae* das algas vermelhas são atualmente as principais fontes de ágar para as indústrias, especialmente devido ao seu alto rendimento (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003; PORSE, 2017). Além de serem usadas na produção de ágar, algumas espécies de *Gracilaria* também são usadas como alimentos, o que as torna um alvo atrativo para a procura de biomoléculas de uso industrial (TORRES *et. al*, 2019).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar a estrutura e reologia do polissacarídeo hidrolisado e sulfatado quimicamente extraído da alga vermelha *Gracilaria intermedia*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Coletar e identificar espécimes da alga marinha vermelha *Gracilaria intermedia*;
- Extrair o polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Gracilaria intermedia* (PGi);
- Determinar o teor de carboidrato e proteínas contaminantes do PGi;
- Realizar a sulfatação química e a hidrólise do PGi
- Realizar a análise elementar dos polissacarídeos;
- Estimar a massa molar média dos polissacarídeos;
- Caracterizar a estrutura química dos polissacarídeos por ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (^1H), HSQC ($^1\text{H}^{13}\text{C}$) e NOESY ($^1\text{H}^1\text{H}$).
- Caracterizar a viscosidade de cisalhamento dos polissacarídeos em diferentes concentrações;
- Caracterizar a viscosidade aparente dos polissacarídeos em diferentes concentrações;
- Analisar os módulos G' e G'' dos polissacarídeos em diferentes concentrações;

1.3. Materiais e métodos

1.3.1 Coleta e identificação da alga marinha

A alga marinha *G. intermedia* (Figura 1.7) foi coletada na costa atlântica do Brasil (praia de Pacheco, Caucaia, Ceará, coordenadas geográficas: 03°43'5"S e 38°39'21"W) no período de Outubro/2016. A atividade de coleta e de acesso ao patrimônio genético foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob o número A482D49 com a finalidade de Pesquisa Científica.

Um espécime (comprovante N° 2386) foi depositado no Herbário Ficológico do Instituto de Ciências Marinhas da Universidade Federal do Ceará, Brasil. Após identificação, a alga foi seca em temperatura ambiente e enviada para o Laboratório de Proteínas e Carboidratos de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE-Brasil, para posterior utilização.

Figura 7. Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha *Gracilaria intermedia* e sua classificação taxonômica.



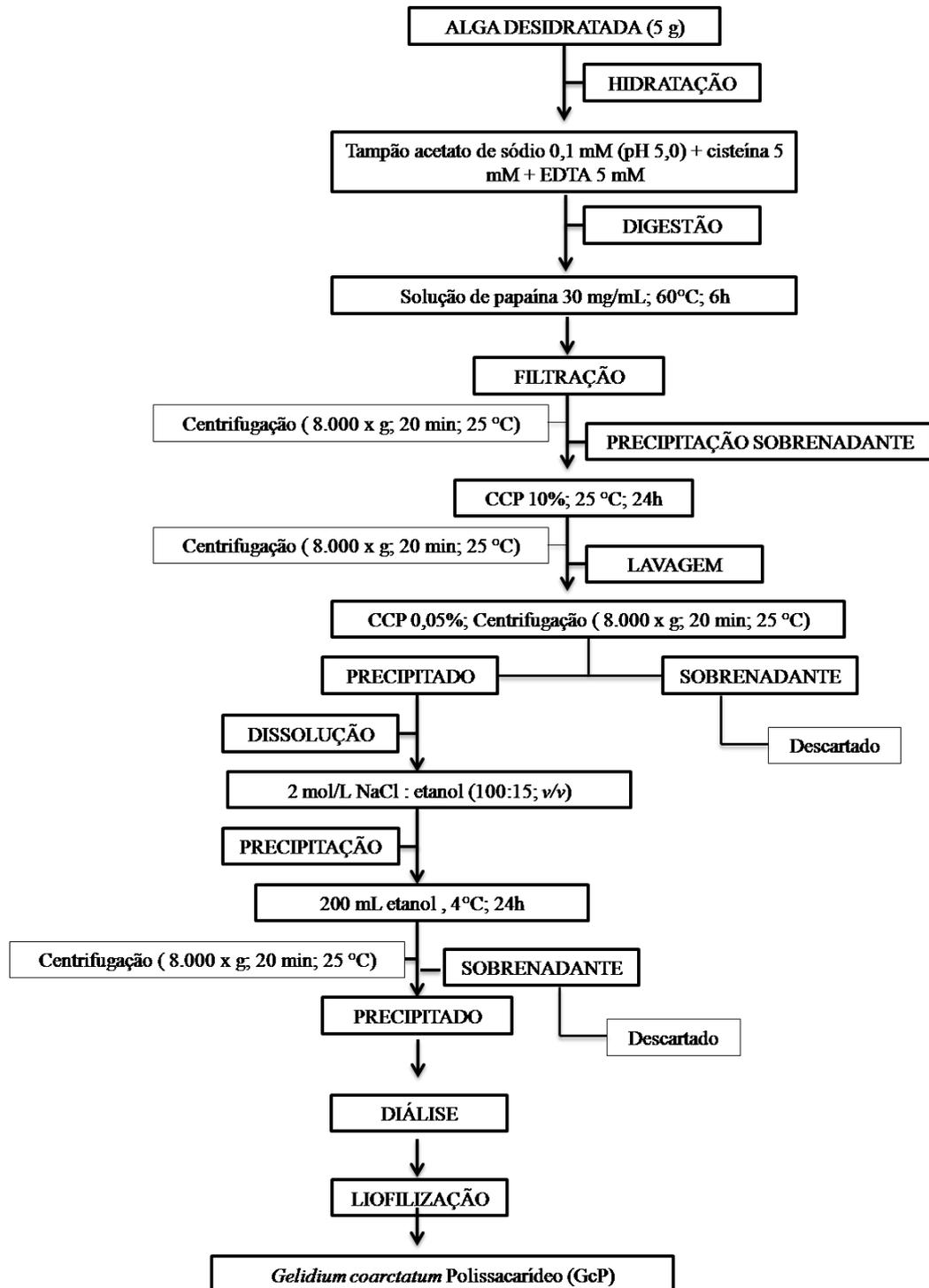
Filo	Rhodophyta
Subfilo	Eurhodophytina
Classe	Florideophyceae
Subclasse	Rhodymeniophycidae
Ordem	Gracilariales
Família	Gracilariaceae
Gênero	Gracilaria
Nome Botânico	<i>Gracilaria intermedia</i> J.Agardh 1901

Fonte: Joana Castro/ Algaebase, 2013.

1.3.2 Extração do polissacarídeo sulfatado (PGi)

A extração do polissacarídeo sulfatado foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Farias *et al.* (2000), com algumas modificações. A alga seca macerada (5 g) foi agitada e incubada por 6 horas a 60 °C em 250 mL do tampão de acetato de sódio 0,1 mol/L com pH 5,0 contendo 5 mmol/L de EDTA e 5 mmol/L cisteína. A digestão de proteínas contaminantes foi realizada com uma solução de 30 mg/mL de papaína bruta. Em seguida, o material foi filtrado em membrana de nylon e centrifugado (8.000 x g; 20 min; 25 °C). O polissacarídeo sulfatado presente no sobrenadante foi precipitado com a adição de 16 mL de uma solução a 10% do cloreto de cetilpiridínio (CCP) e mantido por 24 horas em temperatura ambiente. Após a precipitação, o polissacarídeo sulfatado foi centrifugado novamente (8.000 x g; 20 min; 25 °C) e o sobrenadante descartado. Então, o polissacarídeo sulfatado foi lavado com 500 mL de solução de CCP a 0,05%, centrifugado (8.000 x g; 20 min; 25 °C) e dissolvido em 100 mL de solução 2 mol/L NaCl:etanol (100:15; v/v). O polissacarídeo foi novamente precipitado com a adição de 200 mL de etanol absoluto PA por 24 horas a 4 °C. Após a precipitação, o material foi centrifugado (8.000 x g; 20 min; 25 °C), o precipitado foi dialisado exaustivamente contra água destilada e liofilizado. O polissacarídeo sulfatado obtido da alga marinha *Gracilaria intermedia* foi referido nesse trabalho como PGi. A figura 1.8 esquematiza a extração do PGi.

Figura 8 - Esquema de extração do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Gracilaria intermedia*.



1.3.3 Determinação do teor de carboidratos

Com a finalidade de se avaliar a pureza do polissacarídeo extraído, a determinação do conteúdo de carboidratos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Albalasmeh, Berhe, Ghezzehei (2013). Uma solução padrão (1 mg/mL de PGI) foi preparada e, em seguida, submetida a diluições de 1:50 (v/v) e 1:80 (v/v). A partir destas soluções, 1 mL foi adicionado rapidamente a 3 mL de ácido sulfúrico e agitada por 30 segundos, com aumento da temperatura da solução. Em seguida, a solução foi resfriada em banho de gelo e realizada a leitura de absorvância a 315 nm em um espectrofotômetro ultravioleta (UV). Todas as análises foram realizadas em triplicatas. O conteúdo de carboidratos totais de PGI foi quantificado a partir de uma curva de calibração de concentrações crescentes de 10 a 90 µg de galactose.

1.3.4 Determinação do teor de proteínas contaminantes

A determinação do conteúdo de proteínas contaminantes de PGI foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976), com a finalidade de se avaliar a pureza do material. Inicialmente, foi preparada uma solução padrão de 1 mg/mL de PGI e em seguida foram feitas diluições 1:10 (v/v), 1:50 (v/v) e 1:100 (v/v). A partir dessas soluções, 1 mL foi adicionado a 2,5 mL da solução de Bradford (50 mg de Comassie G-250, 25 mL etanol PA e 50 mL ácido fosfórico 85%) e após 10 min foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 595 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas. O conteúdo de proteínas contaminantes do PGI foi quantificado através da correlação das leituras obtidas com uma curva de calibração crescente de 5 a 50 µg de albumina sérica bovina (BSA).

1.3.5 Composição monossacarídica

Para se avaliar a composição monossacarídica do material, amostras de PGI (5 mg) foram hidrolisadas com ácido trifluoroacético 5 mol.L⁻¹ por 4 h a 100 ° C, reduzidas com boro-hidreto e os alditóis foram acetilados com anidrido acético: piridina (1:1, v/v). Os acetatos de alditóis foram dissolvidos em clorofórmio e analisados em um cromatógrafo gás-líquido / espectrômetro de massa (GCMS-QP2010 Shimadzu, Japão) com uma coluna DB-5ms (Agilent)

1.3.6 Sulfatação química

Após a caracterização, uma parte dos polissacarídeos foi submetida à modificações estruturais, com a finalidade de aumentar o teor de sulfato do material e comparação com o PGI nativo. A sulfatação química dos polissacarídeos de *Gracilaria intermedia* foi realizada de acordo com o método de O'Neill (1955), onde 1 g de polissacarídeos foram imersos em em piridina: formamida (160 ml: 30 ml) sob agitação a 25 °C, por 12 h até a obtenção suspensão final. Posteriormente, essa suspensão foi resfriada a 4°C e foi adicionado 13 mL de ácido clorossulfônico, e deixado sob agitação durante 24h, a 4°C. A solução resultante foi neutralizada com solução aquosa saturada de NaHCO₃, dialisada, centrifugada (8800 rpm, por 25 min) e filtrada através de membranas de acetato com poro de diâmetro de 0,22µm. Em seguida, essa solução foi tratada com NaCl até chegar a uma concentração final de 0,1M e submetida a precipitação com 2 volumes de etanol. Os polissacarídeos obtidos por sulfatação química foram denominados SPGi.

1.3.7 Hidrólise enzimática

Outra parte do PGI extraído foi separada para a hidrólise enzimática, de acordo com Fleita *et al.* (2015) com a finalidade de reduzir o tamanho médio da cadeia e comparação com o PGI nativo. Para a hidrólise enzimática de PGI, dissolveu-se cerca de 1 g de substrato em 15 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M a pH 5,4 e em seguida a enzima β-galactosidase 0,016 g (50 unidades). A mistura foi então incubada em um banho-maria a 37 ° C por 30 minutos. As misturas de reação foram então resfriadas em um banho de água gelada por 10 min para interromper a atividade enzimática. Em seguida, os hidrolisados dialisados e armazenados para posterior análise química. Os polissacarídeos obtidos por hidrólise enzimática foram denominados HPGi.

1.3.8 Determinação do teor de sulfato, hidrogênio e carbono

O teores de enxofre, hidrogênio e carbono dos polissacarídeos extraídos foram determinados por microanálise elementar (2400 CHNS/O Series II – Perkin-Elmer) e o grau de substituição de sulfatação (GS) da molécula foi determinado de acordo com a equação 1 descrito por Melo *et al.*, (2002), a partir dos percentuais de carbono (%C) e enxofre (%S) obtidos. $GS = 4,5 (\%S/\%C)$

1.3.9 Determinação da massa molar média por cromatografia de permeação em gel (GPC)

Foram realizados testes para quantificar a diferença de massa molar média e

composição elementar entre os tratamentos de modificação química. Os picos de massa molar (Mpk) de PGI, HPGi e SPGi foram estimados por GPC com um equipamento Shimadzu (LC-20AD) à temperatura ambiente, utilizando-se uma coluna linear Polysep ($7,8 \times 300$ mm, limite de exclusão: 106 g mol^{-1}), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, concentração de polissacarídeo a 0,5% e NaNO_3 0,1 M como fase móvel. Um refratômetro diferencial e um fotômetro ultravioleta (a 280 nm) foram utilizados como detectores, e o volume de eluição foi corrigido para o marcador interno de etileno glicol a 10,45 mL

1.3.10 Caracterização químico-estrutural por ressonância magnética nuclear (RMN)

Com a finalidade de aprofundar a caracterização químico-estrutural dos materiais obtidos, foi realizada a ressonância magnética nuclear dos materiais. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC de soluções a 2,5% (p / v) de PGI e SPGi em D_2O foram obtidos a 353K em um espectrômetro Bruker Avance DRX 500 com uma cabeça de sonda de gradiente multinuclear inversa equipada com bobinas de gradiente com proteção z e com Silicon Graphics. O padrão interno (2,2 dimetilsilapentano-5-sulfonato) de sódio (DSS) foi utilizado como padrão interno (0,00 ppm por ^1H). Devido à uma falha no equipamento, não foi possível realizar o espectro de RMN de HPGi.

1.3.11 Propriedades reológicas

Para os testes reológicos soluções de PGI, HPGi e SPGi foram preparadas por constante agitação por 12 horas na concentração de 2% (p/v) em água destilada. Esta concentração foi escolhida por ser uma concentração onde ágares são bastante utilizados na indústria como aditivos alimentares (STANLY, 2006). Para se avaliar as propriedades reológicas dos materiais, os ensaios reológicos foram realizados em reômetro modelo AR 550 da TA Instruments utilizando geometria do tipo cone e placa de 20 mm de diâmetro e sistema Peltier para controle da temperatura. As análises de fluxo foram realizadas variando a taxa de cisalhamento de 30 a 1000 s^{-1} em duas diferentes temperaturas, 25 e 37 °C. As curvas de fluxo foram analisadas aplicando o modelo Herschel-Bulkley utilizando o programa Data Analysis da TA Instruments. Também foi realizada rampa de temperatura de 15 a 50 °C, com taxa de cisalhamento fixada em $0,1 \text{ s}^{-1}$. A análise oscilatória foi realizada variando a frequência de 0,1 a 5 Hz, e tensão fixada em 5 Pa, valor de tensão dentro da faixa de viscoelasticidade linear determinada por ensaio de varredura de tensão.

1.4 Resultados e discussão

1.4.1 Rendimento da extração

Na literatura são reportados poucos trabalhos sobre caracterização químico-estrutural de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas do gênero *Gracilaria*, fortalecendo a importância da caracterização do polissacarídeo da alga *Gracilaria intermedia* (PGi) empregada neste estudo. Também é importante ressaltar que um rendimento alto é um fator atrativo para que essa alga seja cultivada como fonte de agar para a indústria.

O PGI foi extraído através de digestão protéica com papaína sob aquecimento, que proporciona alto rendimento e pureza. A partir de 5 g de massa seca da alga marinha foram obtidos 1,75 g de PGI, correspondendo a um rendimento de 35%, considerado alto para algas marinhas. Este valor foi significativamente maior do que foi obtido por Castro *et al.* (2018) com a mesma alga. Isto pode ter ocorrido devido à variação da quantidade de polissacarídeo sulfatado presente na alga decorrente de variações sazonais ou regionais. Estudos com polissacarídeos sulfatados isolados de algas do gênero *Gracilaria* (CROCE, VILAR, & PARODI, 2015; NIL *et al.*, 2016), obtiveram rendimentos de $38,62 \pm 3,1\%$ e $22,34 \pm 3,18\%$, respectivamente. A Tabela 1.1 mostra o rendimento de polissacarídeos sulfatados de outras algas do gênero *Gracilaria*, demonstrando que o rendimento obtido para *Gracilaria intermedia* neste trabalho está dentro da variação esperada para o gênero.

Tabela 1 Rendimento de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas do gênero *Gracilaria*.

Alga		Rendimento (%)
<i>Gracilaria birdiae</i>	(a)	6,50
<i>Gracilaria blodgettii</i>	(b)	26,20 - 37,00
<i>Gracilaria caudata</i>	(h)	32,80
<i>Gracilaria cervicornis</i>	(b)	39,30
<i>Gracilaria chilensis</i>	(j)	40,00
<i>Gracilaria córnea</i>	(c)	21,40
<i>Gracilaria corticata</i>	(d)	21,80
<i>Gracilaria corticata</i>	(e)	9,50 – 16,00
<i>Gracilaria crassa</i>	(e)	12,00 – 23,00
<i>Gracilaria crassissima</i>	(b)	13,10 – 30,00
<i>Gracilaria edulis</i>	(f)	10,90

<i>Gracilaria dura</i>	(g)	32,00-35,00
<i>Gracilaria debilis</i>	(i)	14,80
<i>Gracilaria fisheri</i>	(f)	13,30
<i>Gracilaria gracilis</i>	(k)	36,80

Fonte: (a) Maciel *et al.*, 2008; (b) Freile-Pelegrín, Murano, 2005; (c) Melo, *et al.*, 2002; (d) Andriamanantoanina, Chambat, Rinaudo, 2007; (e) Meena, *et al.*, 2008; (f) Praiboon *et al.*, 2006. (g) Marinho-Soriano, Bourret, 2005, (h) Barros *et al.*, 2013; (i) Mehta *et al.* 2010; (j) Tello-Ireland *et al.*, 2011; (k) Skriptsova, Nabivailo, 2009.

É correto afirmar que algas marinhas apresentam grande variação no conteúdo de galactanas na matriz extracelular, mesmo em espécies do mesmo gênero. Vários fatores podem afetar essa variação, como diferentes espécies, metodologia utilizada para extração dos polissacarídeos sulfatados, fatores fisiológicos das algas, estágio de vida, variações sazonais e mesmo o local de origem dos espécimes (MARINHO-SORIANO; BOURRET 2003; ROMERO; VILLANUEVA; MONTAÑO, 2008). O fato de *Gracilaria intermedia* apresentar alto rendimento neste tipo de extração, aliado à facilidade de cultivo de espécies do gênero *Gracilaria* são fatores atrativos para sua utilização como fonte de agar.

1.4.2 Teor de carboidratos totais e proteínas

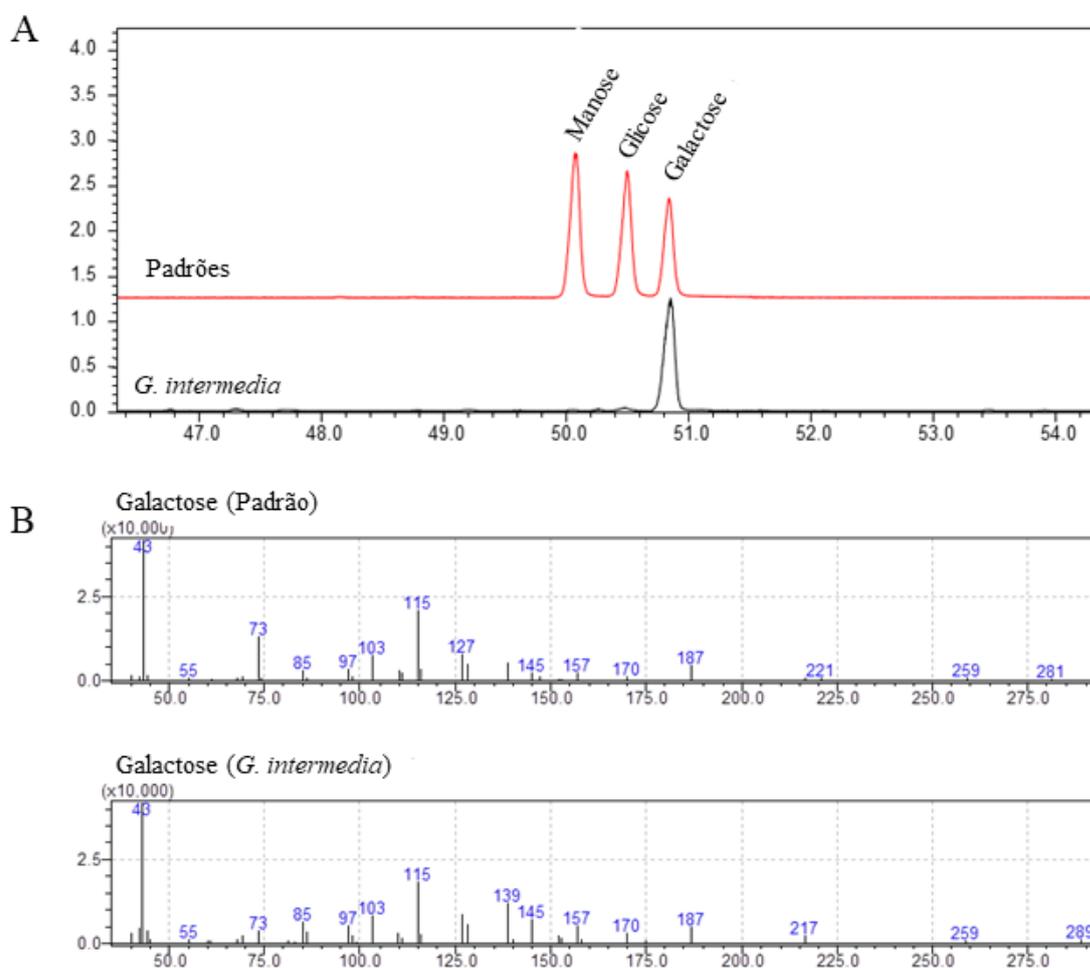
O conteúdo de carboidratos totais do PGI correlacionado com a curva de calibração de galactose, foi de $85 \pm 2,9\%$. Os teores de carboidratos encontrados são considerados altos em comparação aos percentuais de D-galactose encontrados em outras algas do gênero *Gracilaria*. Em frações polissacarídicas da alga *Gracilaria birdiae*, Brasil, foram encontrados teores de açúcares entre 30,8 e 68,2% (VANDERLEI *et al.*, 2011). Amorim *et al.* (2012) realizaram o teste fenol sulfúrico em diferentes frações de *Gracilaria ornata* e encontraram teores de açúcares variando entre 33,14 e 62,20%. A variação na quantidade de carboidrato pode ser decorrente de variações sazonais ou geográficas (PEREIRA *et al.*, 2005). Além disso, as metodologias experimentais utilizadas na determinação dos carboidratos totais também podem ocasionar variações no conteúdo destes compostos (RODRIGUES *et al.*, 2011). Este alto conteúdo de carboidratos totais demonstra a eficiência do processo de extração enzimático, e a porcentagem restante do total pode ser atribuída à presença de grupos sulfato e

outros substituintes na molécula.

As absorbâncias do conteúdo de proteínas contaminantes do PGI ficaram abaixo do poder de detecção do espectrofotômetro, o que demonstra que o material obtido pela extração do PGI não possui contaminação protéica, novamente demonstrando a eficiência do método enzimático em relação à pureza do material.

1.4.3 Composição monossacarídica

A composição monossacarídica de PGI foi determinada com base em cromatografia gasosa e análise por espectrometria de massa dos acetatos de alditol formados após hidrólise ácida. O principal monossacarídeo detectado foi a galactose. Esse achado está de acordo com os resultados apresentados por Pomin & Mourão (2008), que descrevem a presença de galactanos sulfatados em algas vermelhas e de acordo como encontrado por Castro (2018) para esta mesma alga. Nenhum outro açúcar foi detectado até um limite de 2% do peso seco, garantindo a pureza do material. Este resultado confirma o esperado, que este polissacarídeo apresenta uma estrutura homogênea, de acordo com outras espécies de algas marinhas vermelhas produtoras de agar, do genero *Gracilaria*.

Figura 9 – Composição monossacarídica de PGi

(A) Cromatograma da amostra comparada ao padrão (B) Espectros de massa do padrão galactose e de *G. intermedia*

1.4.4 Microanálise elementar e rendimento das modificações químicas

As análises elementares do PGi resultaram em 34,63% de carbono; 1,56% de nitrogênio e 4,35% de enxofre (Tabela 1.2). Considerando essas quantidades o grau de sulfatação (GS) de 0,56. O GS para o polissacarídeo de *G. intermedia* é superior ao observado para outros polissacarídeos de *Gracilaria* coletados no litoral nordeste do Brasil, como *G. birdie* (DS = 0,22; Maciel *et al*, 2008); *G. cornea* (DS 0,22, Melo, Feitosa, Freitas & de Paula, 2002) e *G. caudata* (DS = 0,14 Alencar *et al*, 2019).

Não houve notável diferença entre a composição monossacarídica do polissacarídeo nativo e hidrolisado, como esperado: HPGi apresentou 34,7% de carbono; 1,31% de

nitrogênio e 4,35% de enxofre, com GS igual ao PGI nativo (0,56). Esses resultados demonstram que o processo de hidrólise enzimática utilizado não acarretou em nenhuma alteração no padrão elementar do polissacarídeo, como esperado.

Diferentemente do polissacarídeo hidrolisado, SPGi apresentou alteração em relação ao PGI: 23,7% de carbono; 0,03% de nitrogênio e 10,93% de enxofre, com GS de 2,07. Esses resultados demonstram que o processo sulfatação química utilizado foi bem sucedido, com o aumento do teor de enxofre na molécula, evidenciado pela maior porcentagem desse elemento e grau de sulfatação.

Como citado anteriormente, a quantidade de sulfato nos PLS está tipicamente ligada à suas possíveis atividades biológicas, portanto, um grau de sulfatação maior da molécula é por vezes bastante atrativo. O grau de sulfatação é baseado na estrutura química dos polissacarídeos, que são constituídos por unidades dissacarídicas contendo uma unidade β -D-galactopiranosose (unidade A) ligada a uma unidade α -D-galactopiranosose ou 3,6-anidrogalactose (unidade B), em que o conteúdo de sulfatação é definido com o número de OSO^3 ou átomos de enxofre por cada unidade dissacarídica repetida (MELO *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2013).

Tabela 2 Microanálise elementar do PGI nativo, supersulfatado e hidrolisado;

Amostra	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Enxofre (%)	Grau de Sulfatação (%)
PGI	34,63	1,56	4,35	0,56
SPGi	23,7	0,03	10,93	2,07
HPGi	34,7	1,31	4,35	0,56

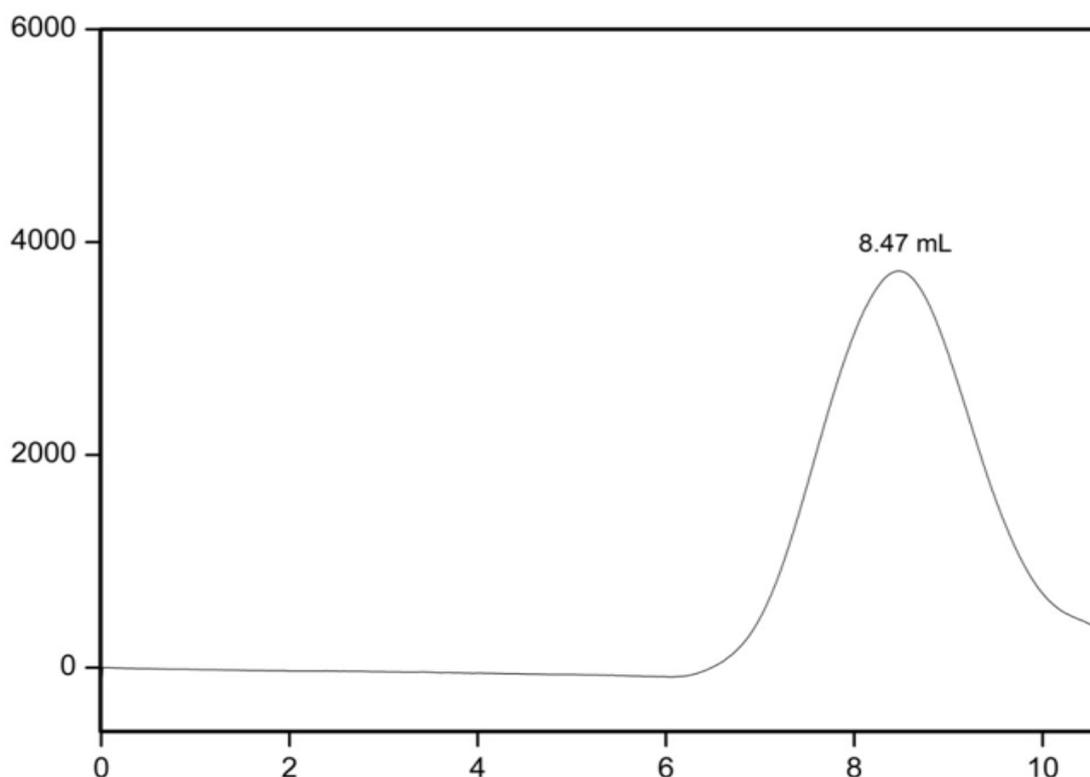
Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação ao rendimento do processo de modificação estrutural, HPGi apresentou um rendimento de 94% na hidrólise enzimática. Este tipo de hidrólise apresenta rendimentos maiores do que a hidrólise ácida, por haver menor risco de destruir completamente a cadeia polissacarídica (HOLTKAMP *et al.*, 2009). Rendimentos altos são atrativos para a indústria, por ocasionarem menos perda de material. O rendimento de SPGi obtido no processo de sulfatação química foi 56%. Outros trabalhos de sulfatação de polissacarídeos pelo mesmo método encontraram valores semelhantes de rendimento (NETO *et al.*, 2014.) Para se obter

maiores rendimentos pode-se aplicar alterações nos padrões operacionais, como tempo e temperatura (NETO *et al.*, 2011).

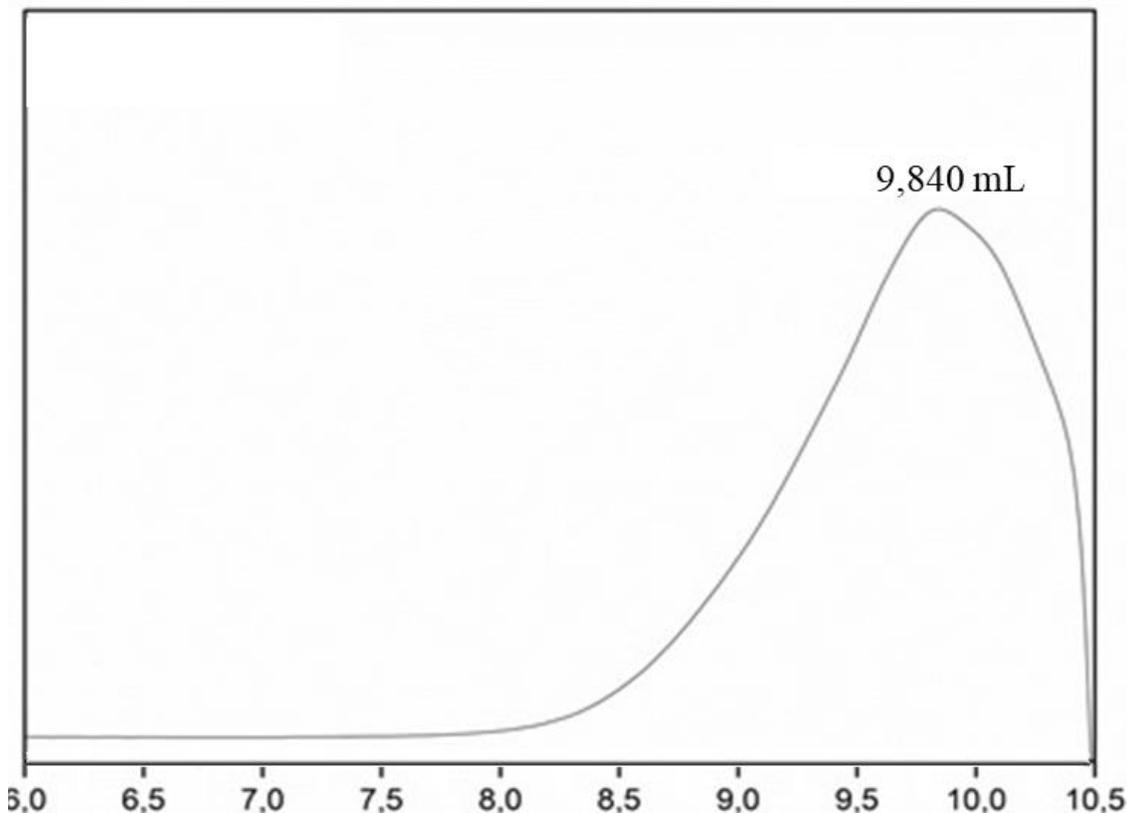
1.4.5 Peso Molecular de PGI

O cromatograma de permeação em gel do PGI nativo mostrou um único pico amplo a 8,47 mL (Figura 1.10). O pico estimado de massa molar (Mpk) do polissacarídeo de *G. intermedia* foi de $4,1 \times 10^5$ g/mol, com base em uma curva de calibração obtida com pululanas. O cromatograma de permeação em gel revelou que PGI é uma molécula de alto peso molecular com um pico de massa molecular de 400 kDa. Galactanas de alto peso molecular são comuns em algas vermelhas (Pomin, 2009) e foram descritos para outros polissacarídeos do gênero *Gracilaria*. Um polissacarídeo extraído de *Gracilaria birdiae* apresentou um pico de massa molar de 350 kDa (Souza *et al.*, 2012), enquanto Barros *et al.*, (2013) demonstraram que um ágar de *Gracilaria caudata* apresentou um pico de massa molar de 250 kDa. Além disso, PGI mostrou um pico amplo, comportando-se como um sistema polidisperso. Polímeros sintéticos e polissacarídeos de ocorrência natural são polidispersos, o que significa que, em geral, eles não possuem pesos moleculares nitidamente definidos, mas possuem pesos moleculares médios representando uma distribuição de espécies moleculares quase idênticas em estrutura, mas variando em seu comprimento de cadeia (Pomin, 2009). Perfis de cromatogramas de agaranas e carragenanas são frequentemente encontrados com esse comportamento, como exemplo nos estudos de Barros *et al.*, (2013) e Sousa *et al.*, (2016) com os polissacarídeos sulfatados das algas marinhas *Gracilaria caudata* (agarana) e *Solieria filiformis* (carragenana), respectivamente, rodófitas comuns da costa do atlântico brasileiro.

Figura 10 – Cromatografia de permeação em gel de PGI nativo

O cromatograma de permeação em gel do HPGi mostrou um único pico amplo a 9,840 mL (Figura 1.11). O pico estimado de massa molar (Mpk) do polissacarídeo de *G. intermedia* foi de $1,05 \times 10^4$ g/mol, com base em uma curva de calibração obtida com pululano de diferentes massas molares, revelando que HPGi é uma molécula de baixo peso molecular com um pico de massa molecular de 1,7 kDa demonstrando que a hidrólise enzimática foi eficiente para a redução da massa molar média do polissacarídeo, devido à sua alta especificidade. O cromatograma de permeação em gel de SPGi demonstrou uma leve diminuição da massa molar, para 304 KDa (Dados não mostrados), Além disso, o cromatograma para ambas as moléculas continuou a apresentar um perfil de único pico amplo polidisperso, o que indica que o processo levou à formação de diversas cadeias menores de comprimentos diferentes.

Figura 11 – Cromatografia de permeação em gel de HPGi



1.4.6 Caracterização químico-estrutural por ressonância magnética nuclear

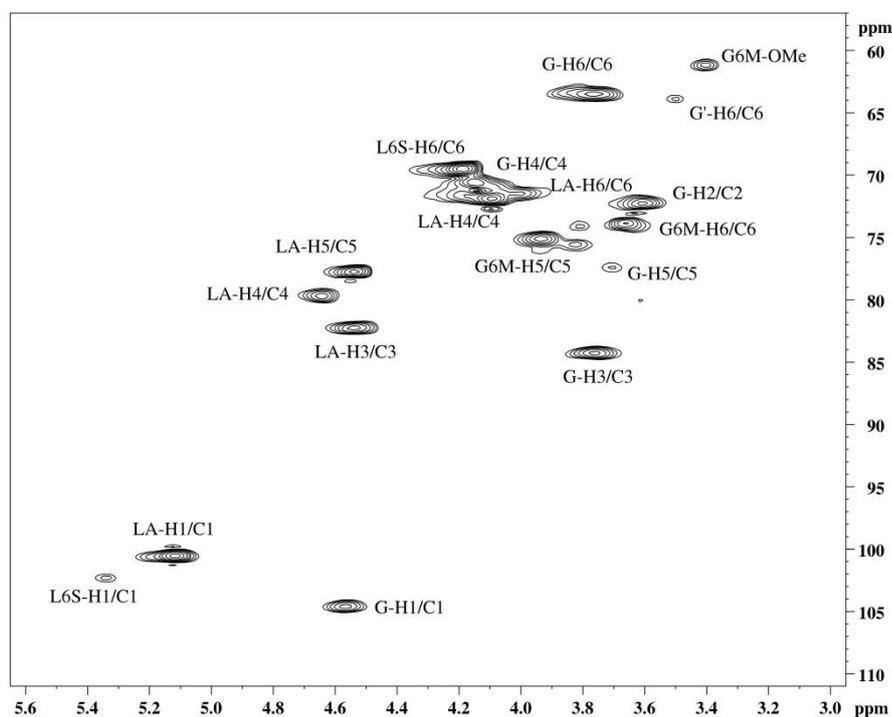
A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) é bastante utilizada para a identificação de galactanas presentes em algas marinhas, sendo uma ferramenta padrão ouro para elucidação de estruturas químicas de polissacarídeos de carragenanas e agaranas, utilizada na indústria e por pesquisadores com diferentes abordagens correspondentes a diferentes objetivos ou interesses (VAN DE VELDE *et al.*, 2002; POMIN, 2010). Dessa maneira, a espectroscopia de RMN foi realizada para elucidar a estrutura química dos polissacarídeos extraído da alga *Gracilaria intermedia*.

O espectro HSQC de PGi (Figura 1.12) apresenta a correlação entre os carbonos e seus respectivos prótons. Na região anomérica, dois sinais intensos estavam presentes em 104,7 / 4,55 ppm e 100,6 / 5,13 ppm e atribuídos a C-1 / H-1 de β -D-galactopiranosose e C-1 / H1 de 3,6- α -L -anidrogactose, respectivamente, demonstrando que o polímero é uma galactana do tipo agarana (USOV *et al.*, 1980; LAHAYE *et al.*, 1989; MILLER; FURNEAUX, 1997; BARROS *et al.*, 2013). Também foi observado um sinal baixo e intenso a 102,2 / 5,35 ppm, que foi designado como carbono / próton anomérico da 6-O-sulfato- α -L-galactose (LAHAYE

et al., 1989; BARROS *et al.*, 2013). Este resíduo está frequentemente presente como uma substituição parcial da 3,6-a-L-anidrogactose (izumi *et al.*, 1992).

Um pequeno sinal a 1,44 ppm foi atribuído a prótons de um grupo metil de cetal do ácido pirúvico e considerado um substituinte menor ($\pm 0,8\%$) no polissacarídeo de *G. intermedia* (IZUMI, 1973; MAZUMDER *et al.*, 2002; MURANO, 1992a b) 1995). O espectro HSQC de *G. intermedia* também mostrou um grupo substituinte metil como uma 6-O-metil- β -D-galactopiranosose com um sinal a 61,2/ ,41 ppm (LAHAYE; ROCHAS; YAPHE, 1986; MURANO *et al.*, 1992; MAZUMDER *et al.*, 2002). Esse grupo é comum nas espécies de *Gracilaria*, variando com as espécies no grau de substituição (CRAIGIE; WEN; VANDERMEER, 1984; DUCKWORTH *et al.*, 1971; FURNEAUX; MILLER; STEVENSON, 1990; MINGHOU; LAHAYE; YAPHE, 1984). 1985; LAHAYE; ROCHAS; YAPHE, 1986; MURANO *et al.*, 1992; MONTANO *et al.*, 1999; VILLANUEVA; MONTANO, 1999). A correlação entre carbonos e prótons é descrita na tabela 1.3.

A composição de PGI foi estimada a partir de integrais de espectro ^{13}C RMN, como proposto por Maciel *et al* (2008). A razão molar de LA:G:G6M foi de 1:0,89:0,29. Com base nesta composição, é possível afirmar que o polissacarídeo extraído possui principalmente um esqueleto de agarana.

Figura 12 – Ressonância Magnética Nuclear HSQC do PGI nativo**Tabela 3** Assinalamentos químicos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do PGI nativo.

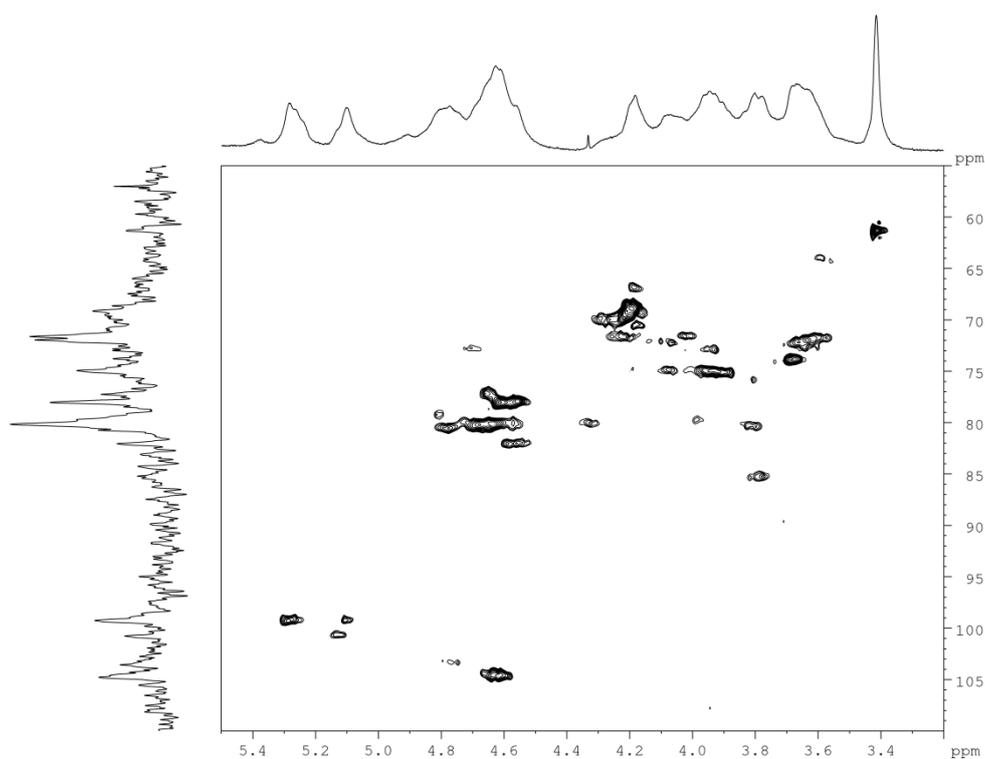
Unit ^a	Assinalamentos de ^1H						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	O-Metil
G	4.55	3.62	3.76	4.15	3.72	3.76	-
LA	5.13	4.10	4.54	4.65	4.54	4.02	-
L6S	5.35	b	b	b	b	b	-
G6M	b	b	b	b	b	b	3.41

Unit ^a	Assinalamentos de ^{13}C					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
G	104.7	72.3	84.4	70.6	77.6	63.6
LA	100.6	72.0	82.3	79.8	77.8	71.7

O espectro HSQC de SPGI (Figura 1.13) apresenta a correlação entre os carbonos e seus respectivos prótons. Da mesma forma como PGI nativo, foram encontrados sinais correspondentes a C-1 / H-1 de β -D-galactopiranosose (104,7 / 4,61 ppm) e e C-1/ H1 de 3,6-

α -L-anidrogactose (100,6 / 5,11 ppm), demonstrando que o polímero, da mesma forma que o PGI nativo, também é uma galactana do tipo agarana, como esperado já que o processo de sulfatação química não altera a composição monossacarídica (USOV *et al.*, 1980; LAHAYE *et al.*, 1989; MILLER; FURNEAUX, 1997; BARROS *et al.*, 2013). Ao contrário de PGI nativo, não foi observado sinal para o carbono / próton anomérico da 6-O-sulfato- α -L-galactose nem para o grupo metil de cetal do ácido pirúvico e considerado um substituinte menor.

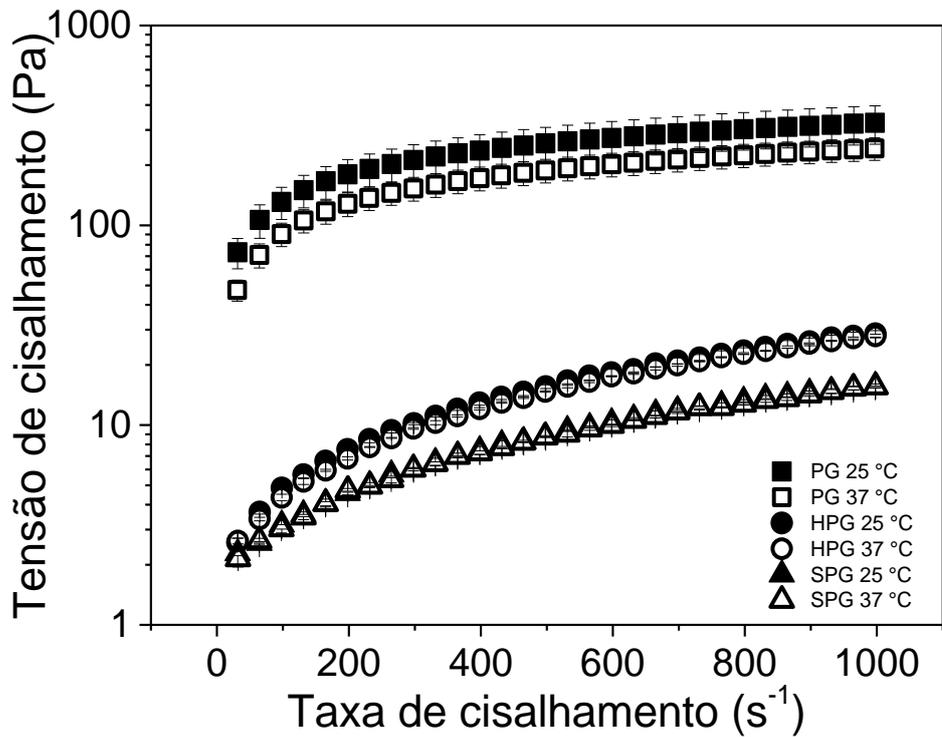
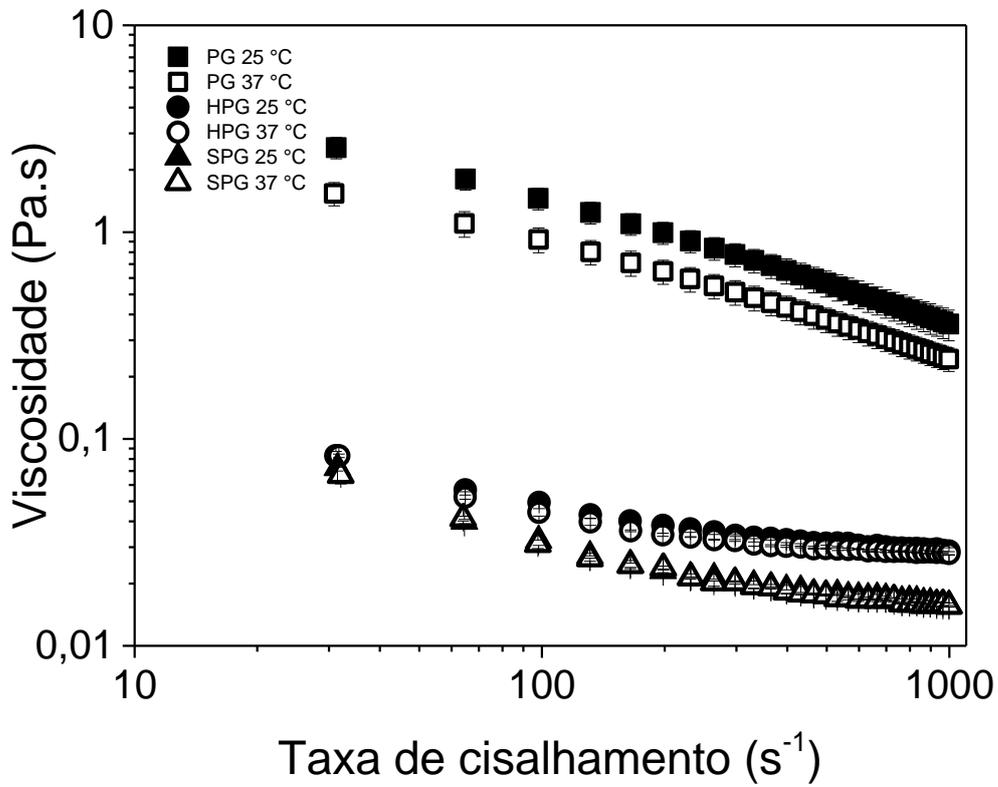
Figura 13 – Ressonância Magnética Nuclear HSQC de SPGi



1.4.7 Comportamento reológico

A Figura 1.14 mostra o comportamento reológico de PGI, HPGi e SPGi 2% *p/v*). Com o aumento da força iônica, o PGI apresentou menor viscosidade como o aumento da taxa de cisalhamento. A solução de 225mg , com maior força iônica, apresentou maior redução da viscosidade aparente, entretanto o polissacarídeo solúvel em água destilada permaneceu com maior viscosidade aparente, quando submetido a taxa de cisalhamento.

Figura 14 – Curvas de cisalhamento do PGI em diferentes concentrações



As curvas de fluxo (taxa de cisalhamento vs. tensão de cisalhamento) exibem comportamento não linear e uma tensão de cisalhamento inicial, esse comportamento pode ser bem ajustado ao modelo Herschel-Bulkley apresentado na equação 1.

$$\sigma = \sigma_0 + \eta \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

Onde:

σ_0 é a tensão de cisalhamento inicial; σ é a tensão de cisalhamento; η é a viscosidade; $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento; n é o índice de comportamento do fluido.

Tabela 4 – Parâmetros do comportamento reológico de PGi, HPGi e SPGi

Amostras		Parâmetros		
		σ_0 (Pa)	η (Pa.s)	N
25 °C	PG 2%	-102.3±14.4	70.9±10.2	0.26±0.04
	HPG 2%	1,7±0,0	0,036±0,001	0,95±0,01
	SPG 2%	1,7±0,1	0,017±0,002	0,97±0,01
37 °C	PG 2%	-95.5±1.8	58.4±0.4	0.26±0.01
	HPG 2%	2,0±0,04	0,020±0,001	1,04±0,01
	SPG 2%	1,7±0,01	0,015±0,000	0,99±0,00

As modificações químicas de PGi resultaram em uma diminuição da viscosidade da solução (Tabela 2.1). Como esperado, quanto maior o tamanho médio da cadeia do polissacarídeo, maior a viscosidade aparente. Com o aumento da temperatura, PGi e suas formas alteradas quimicamente em solução aquosa diminuíram gradualmente a viscosidade aparente. Este fato ocorre naturalmente devido à maior agitação das moléculas em solução decorrente da maior temperatura no sistema.

O ágar é utilizado para diversos fins nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e médica, principalmente devido à sua característica de formar gel em baixas concentrações e temperaturas (ARMISEN; GAIATAS, 2009; NISHINARI; FANG, 2017). Mesmo ágares que não podem formar géis também são empregados na indústria, como no uso de meios de cultura (LAHAYE; ROCHAS, 1991; SANDLE, 2014) e matriz de eletroforese (CORTHELL, 2014; DRABIK; BODZON-KULAKOWSKA; SILBERRING, 2016).

Neste contexto, as propriedades reológicas do ágar produzido pela alga vermelha *Gracilaria intermedia* (PGi) foram medidas para avaliar o comportamento do polímero em relação ao suas propriedades reológicas.

O comportamento do PGi na viscosidade aparente versus a taxa de cisalhamento mostrou que todas as variantes testadas se comportaram como pseudoplásticas, com aumento

da taxa de cisalhamento levando a uma diminuição da viscosidade até estabilização (GRANT *et al.*, 2012). O comportamento pseudoplástico do PGi pode ser atribuído à ruptura da estrutura da dupla hélice presente em agaranas Grant *et al.*, (2012), que formam géis em ambientes aquosos via formação de hélices e agregados de cadeias polissacarídicas através de ligações intermoleculares de hidrogênio (MORRIS, 1986; SCHAFER; STEVENS, 1995).

No entanto, os ágaros são sintetizados *in natura* com inerente heterogeneidade em sua estrutura química, e podem possuir precursores como α -L-galactose-6-sulfato em vez de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, bem como outras estruturas híbridas (RHEIN-KUDSEN; ALE; MEYER, 2015). A quantidade destes precursores e variações estruturais em diferentes espécies de algas vermelhas obviamente afetam as propriedades reológicas dos hidrocolóides e, conseqüentemente, suas aplicações (RHEIN-KNUDSEN *et al.*, 2017).

Seguindo a premissa do estudo realizado por Manhivi *et al.*, (2018), polímeros com o comportamento viscoso semelhante ao do PGi, principalmente em temperatura ambiente, mostra que o polissacarídeo tem potencial para aplicações na indústria de alimentos com capacidade de modificar a viscosidade de alimentos, e em concentrações baixas o PGi pode ser utilizado como agente emulsificante e estabilizante de bebidas.

1.5 Conclusão

Através das dosagens dos componentes químicos do PGI pode-se afirmar que a extração do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Gracilaria intermedia* foi eficiente, apresentando excelente rendimento, quando comparado com outras espécies de *Gracilaria*, e conseguiu atingir um alto grau de pureza da molécula. A hidrólise do polissacarídeo foi bem sucedida, gerando um composto de menor massa molecular e a sulfatação química também foi bem sucedida, gerando um composto com maior quantidade de sulfato. O polissacarídeo foi classificado como um ágar apresentando esqueleto carbônico composto principalmente de β -D-galactopiranosose ligado a 3,6 α -L-anidrogactose com grupos substituintes de metil e ácido pirúvico. A resposta predominantemente viscosa e um comportamento reológico pseudoplástico do polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Gracilaria intermedia* sugere um potencial uso deste polímero como agente espessante e / ou gelificante, especialmente para aplicação na indústria alimentícia ou farmacêutica. Estas características químicas fazem com que a alga marinha *Gracilaria intermedia* seja uma promissora fonte de ágar para uso industrial, nas áreas farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

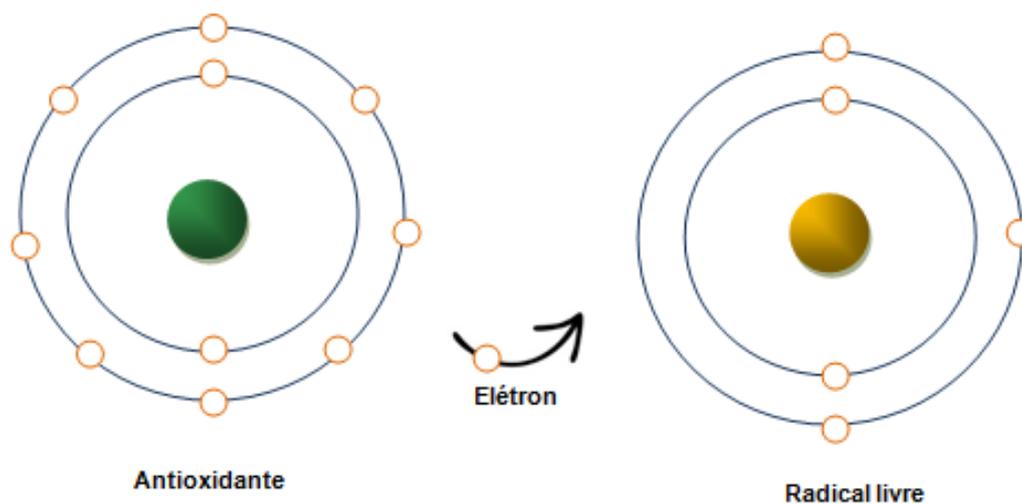
2 CAPITULO II: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COAGULANTE DO POLISSACARÍDEO DE *Gracilaria intermedia* COM MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS

2.1 Introdução

2.1.1 Estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas que possuem um elétron desemparelhado externo à sua órbita (Figura 2.1) diminuindo a sua estabilidade e ampliando sua capacidade de reagir com outras moléculas, principalmente com constituintes celulares como: lipídios de membranas, proteínas e ácidos nucleicos, podendo ocasionar a morte celular (FERNANDES *et al.*, 2012; SILVA, CERCHIARO, HONORIO, 2011).

Figura 15 – Representação esquemática da estabilização do radical livre



Fonte: ALENCAR (2016)

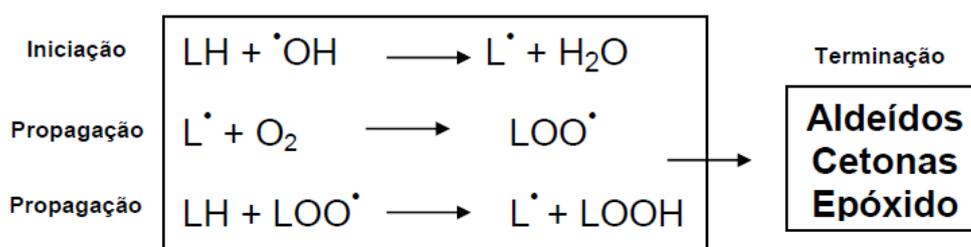
O estresse oxidativo é definido quando o excesso de radicais livres, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de oxigênio (EROs), causam um dano tecidual ou produzem moléculas tóxicas ou prejudiciais às células. Logo, afirma-se que o estresse oxidativo ocorre quando o organismo encontra-se em um processo complexo de desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes. Um dos principais mecanismos de injúria celular é a peroxidação lipídica (PL), ou seja, a oxidação de lipídios de membranas (SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004).

Os principais radicais livres encontrados em processos biológicos são ERNs e as EROs. Entre as ERNs as mais danosas são: óxido nítrico, peroxinitrila, ácido peronitroso e dióxido de nitrogênio, enquanto que as EROs com maior potencial danoso a sistemas celulares são: ânion superóxido, radical hidroxila, radical peroxila, peróxido de hidrogênio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete e ozônio (SILVA; CERCHIARO; HONORIO, 2011).

Em pequenas quantidades, as EROs desempenham importantes funções fisiológicas, porém, quando são formadas excessivamente o organismo entra em um estado de estresse oxidativo, que pode estar relacionado a processos patológicos, como inflamações, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes melitus, úlceras gástricas entre outras (SEIFRIZ, 2008; NELSON; COX, 2014; TAKAHASHI, SHIBATA, NIKI, 2001; STEGHENS *et al.*, 2001; DE MORAIS *et al.*, 2009; LAINE; WEINSTEIN, 2009). Nas indústrias, esse fenômeno pode acarretar no desenvolvimento de odores e/ou sabores desagradáveis, fazendo com que os produtos não sejam aceitos para consumo humano. Além disso, a PL pode afetar a cor, textura e aparência dos produtos, principalmente em produtos alimentícios (BRADLEY; MIN, 1992; JACOBSEN *et al.*, 2019).

O excesso de EROs na PL, têm como alvos moleculares os ácidos graxos poliinsaturados por sua susceptibilidade devido a presença de grupos metilênicos entre as duplas ligações. Isso acontece devido à extração de um átomo de hidrogênio dos grupos metilênicos produzindo um novo radical que reage facilmente com oxigênio em uma reação de cadeia denominada auto-oxidação (Figura 2.2). Para se evitar a auto-oxidação são necessários compostos antioxidantes capazes de capturar rapidamente os radicais peroxilas formados (HALLIWELL, CHIRICO, 1993; SOLOMONS; FRYHLE, 2006)

Figura 16 - Representação esquemática da peroxidação lipídica*.



*(LH: ácido graxo insaturado; L: radical lipídico; LOO: radical peroxila; LOOH: hidroperóxido lipídico). Fonte: ALMEIDA (2014).

A PL em membranas biológicas acarreta na perda de função da membrana celular, mudança na fluidez, alterações na permeabilidade, inativação de receptores de membrana, inativação de enzimas, incapacidade de selecionar a entrada e saída de nutrientes e substâncias essenciais à célula (BARBER; HARRIS, 1994). Além disso, a PL produz produtos tóxicos, como o 4-hidroxinonal e malondialdeído (MDA), que contribuem para a perda de sinalização e toxicidade celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

Diante dos problemas do excesso de EROs e ERNs, os organismos necessitam de mecanismos capazes de eliminar os radicais livres deletérios as células. Entre os mecanismos, as moléculas antioxidantes, naturais ou sintéticas, possuem elevada estabilidade oxidativa desempenhando um papel crucial na prevenção à oxidação de substâncias. Dessa maneira, os antioxidantes são definidos como moléculas que possuem a capacidade de proteger os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios ou de reações químicas ocasionados por radicais livres, que causam excessiva oxidação nas células (AUST *et al.*, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2015; REN *et al.*, 2014).

2.1.2 Antioxidantes naturais e sintéticos

As indústrias a fim de evitar os problemas da PL adicionam em seus produtos moléculas antioxidantes de origem natural ou sintéticos. Esses antioxidantes podem atuar de maneira direta, conhecidos como antioxidantes primários, reagindo diretamente com radicais livres e convertendo-os em produtos mais estáveis e menos reativos. Em contraste, os antioxidantes secundários, atuam de maneira indireta por diferentes mecanismos, tais como: quelação de metais de transição, estabilização de hidrogênios de antioxidantes primários, sequestro de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, dentre outros (CHOE; MIN, 2009).

Os antioxidantes sintéticos e naturais são moléculas com a capacidade de prevenir, interceptar e/ou reparar as injúrias oxidativos às macromoléculas, causados principalmente por radicais livres (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015). Pensando no efeito benéfico dos antioxidantes, principalmente de origem natural para consumo humano, os mesmos devem agir preferencialmente por mais de um mecanismo, por exemplo: complexação de íons metálicos, captura de radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição de enzimas responsáveis pela geração de EROs e ERNs e/ou pela modulação de vias sinalizadoras celulares (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Portanto, é crucial o entendimento dos mecanismos físicos e químicos de como atuam as moléculas antioxidantes sintéticas e naturais atuam, assim como da interação entre compostos pró-oxidantes e antioxidantes, a fim de desenvolver soluções para aumentar a estabilidade de diversos produtos destinados ao consumo humano

(MCCLEMENTS; DECKER, 2017).

Os antioxidantes sintéticos são muito mais eficientes na proteção de produtos contra os radicais oxidantes, principalmente em produtos alimentícios. Entre os mais conhecidos, encontram-se os antioxidantes: ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), butilado de hidroxianisol (BHA), butilado de hidróxitolueno (BHT) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), que possuem como vantagens eficácia contra peroxidação lipídica, baixo custo e alta estabilidade em alimentos. Porém, possuem restrições para o uso com alimentos, devido seus riscos a saúde presentes e sua toxicidade, principalmente o BHA e BHT (THOMPSON; MOLDEUS, 1988; CLAYSON *et al.*, 1990; SAKAI; MIYATA; TAKAHASHI, 1990; PETERS *et al.*, 1996; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 1998; SAITO; SAKAGAMI; FUJISAWA, 2003; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Por outro lado, o uso de antioxidantes de origem naturais aumentou devido à preocupação do público em geral sobre os riscos a saúde do uso de antioxidantes sintéticos. A preferência do uso de produtos naturais está diretamente correlacionada à sua baixa toxicidade em geral (HALLIWEL, 1996; JACOBSEN *et al.*, 2019). Adicionalmente, a utilização de extratos naturais torna-se mais vantajoso por estes conterem diferentes compostos com diferentes propriedades antioxidantes (JACOBSEN *et al.*, 2019)

2.1.3 Efeito antioxidante das galactanas de algas marinhas

A busca de moléculas antioxidantes derivadas de algas surgiu a partir da observação de que algas marinhas secas podem ser estocadas por longos períodos de tempo sem perigo de deterioração oxidativa, despertando o interesse de pesquisadores em relação aos mecanismos antioxidantes presentes nestes organismos (ROCHA *et al.*, 2007). Atualmente, as propriedades antioxidantes dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas continuam a ser estudadas (GOMES *et al.*, 2018; HENTATI *et al.*, 2018; MARINHO *et al.*, 2019; ALENCAR *et al.*, 2019; FARVIN *et al.*, 2019). Diante da constante exposição das algas marinhas a condições climáticas intensas, com variações de oxigênio, temperatura e insolação, esses organismos desenvolveram formas de minimizar os efeitos adversos provocados por fatores abióticos através de moléculas com propriedades antioxidantes (COSTA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010).

Existem diversos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* para avaliar a capacidade antioxidante de moléculas, por meio de diferentes mecanismos. Entretanto, não há um único método que possa avaliar todos os mecanismos antioxidantes de um determinado material (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005). Isso se dá devido aos diversos tipos de radicais livres e suas

diferentes formas de reagir com macromoléculas. Portanto, para se determinar a capacidade antioxidante total de um composto, diversos testes devem ser realizados.

Vários trabalhos associam essa atividade aos polissacarídeos sulfatados, constituintes das estruturas das algas (COSTA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010). Segundo Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995), a interação de um potente antioxidante com o radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) depende do número de grupos hidroxílicos disponíveis, então se acredita que o potencial antioxidante dos polissacarídeos sulfatados esteja relacionado à sua estrutura química, que apresenta hidroxilas livres, favorecendo assim a abstração dos átomos de hidrogênio (MENSOR *et al.*, 2001). Conceitualmente, os polissacarídeos de alto peso molecular são menos ativos do que os de baixo peso molecular devido à sua fraca capacidade de penetração nas membranas celulares, a degradação dos polissacarídeos de alto peso molecular pode melhorar visivelmente suas atividades biológicas (WU, *et al.*, 2007). Zhou *et al.* (2008) relataram que a fração de baixo peso molecular de *Sargassum fusiforme* aumentou a atividade antioxidante.

Outra característica importante na estrutura química dos polissacarídeos é o grau de sulfatação, em que vários trabalhos relataram maior efeito antioxidante de frações polissacarídicas com maior grau de substituição de sulfato (SHAO; CHEN; SUN, 2014; JIMÉNEZ-ESCRIG; GÓMEZ-ORDOÑES; RUPÉREZ, 2014).

Com base no potencial antioxidante dos polissacarídeos sulfatados, assim como sua habilidade de formar géis em temperatura ambiente, vários estudos são encontrados com aplicação de géis com capacidade antioxidante, com a finalidade de gerar produtos antioxidantes com potencial para uso pelas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (ARMISEN, 1995; PATEL, 2018; SANZ *et al.*, 2019; FERNANDO *et al.*, 2019; VENUGOPAL, 2019). Nesse contexto, os polissacarídeos sulfatados reúnem propriedades extramamente interessantes, dentre as quais o seu potencial antioxidante e suas propriedades reológicas, atraindo o interesse para aplicação industrial.

2.1.4 Hemostasia e coagulação sanguínea

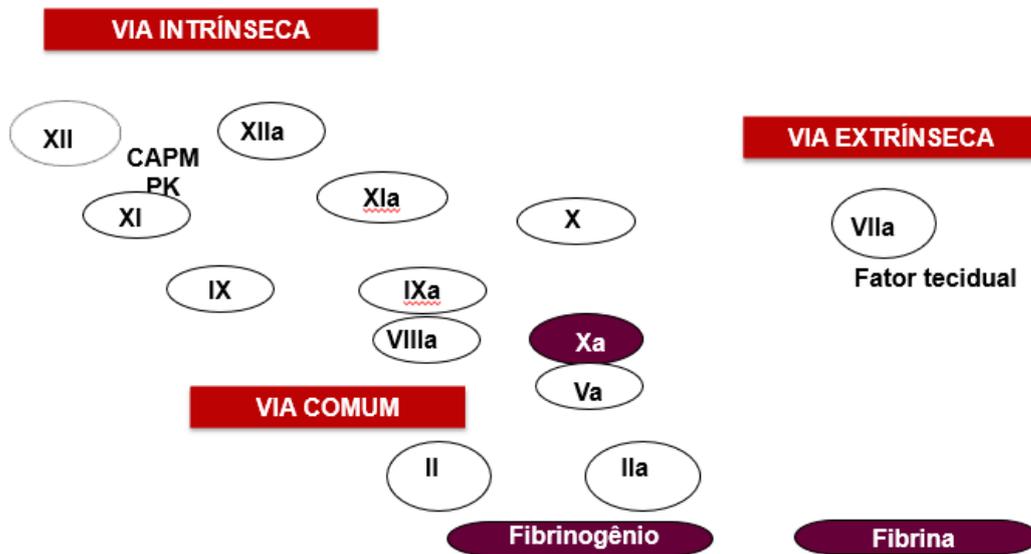
A hemostasia é uma resposta fisiológica que envolve a coagulação do sangue e sua interrupção, esse processo é necessário para evitar o sangramento excessivo ou a formação de trombos, mantendo o fluxo sanguíneo normal (HA; BHAGAVAN, 2011). O conjunto de mecanismos que acionam esse processo é formado pelo espasmo muscular vascular (vasoconstrição), agregação plaquetária (tampão plaquetário), formação do coágulo sanguíneo

e sua posterior dissolução (fibrinólise). Durante essas etapas, ocorrem interações entre proteínas plásmáticas, componentes dos tecidos e receptores celulares (DE REVEL; DOGHMI, 2004; HA; BHAGAVAN, 2011). O sistema hemostático pode ser dividido entre hemostasia primária, que consiste na vasoconstrição e agregação plaquetária (tampão plaquetário) e a hemostasia secundária, que refere-se a formação do coágulo sanguíneo, realizada pela cascata de coagulação proteolítica (ANDREW J. GALE, 2011).

A coagulação consiste em interações complexas nas quais o sangue perde suas características de fluido, sendo convertido em massa semi-sólida, formando um coágulo reversível, pela interação do tecido lesado, plaquetas e fibrina (BANKS, 1991). O mecanismo bioquímico da formação do coágulo sanguíneo envolve uma seqüência interações proteína-proteína (SWENSON, 1996). Consiste na conversão de uma proteína solúvel do plasma, o fibrinogênio em fibrina, por ação de uma enzima denominada trombina (BOZZINI, 2004). Esse processo tem diversas etapas de ativação, seqüenciais, onde o substrato para cada enzima (ou complexo enzimático) é uma pró-enzima que é ativada para agir na próxima etapa da reação, seqüência de reações freqüentemente denominada “cascata” (GUYTON & HALL, 2011; KERR, 2003).

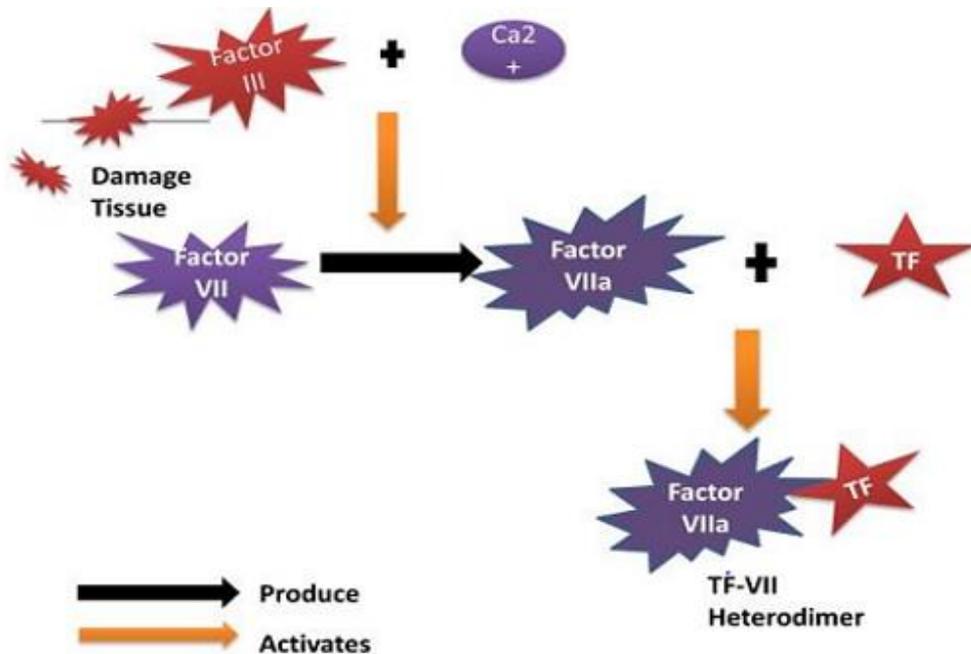
A cascata de coagulação possui dois mecanismos relacionados intimamente, que quando são estimulados, podem produzir fibrina (Figura 2.3). O mecanismo intrínseco e o mecanismo extrínseco. O mecanismo intrínseco consiste numa sequência de reações enzimáticas que se inicia quando o sangue entra em contato com uma superfície lesada. Por sua vez, o mecanismo extrínseco refere-se a sequência de reações que ocorrem quando a lesão de um vaso sanguíneo resulta na liberação de extratos teciduais (SWENSON, 1996). Estas duas vias convergem para a ativação do fator X na via comum, o que leva, à formação de fibrina (BANKS, 1991).

Figura 17 Esquema da cascata da coagulação com a divisão do sistema de coagulação em duas vias



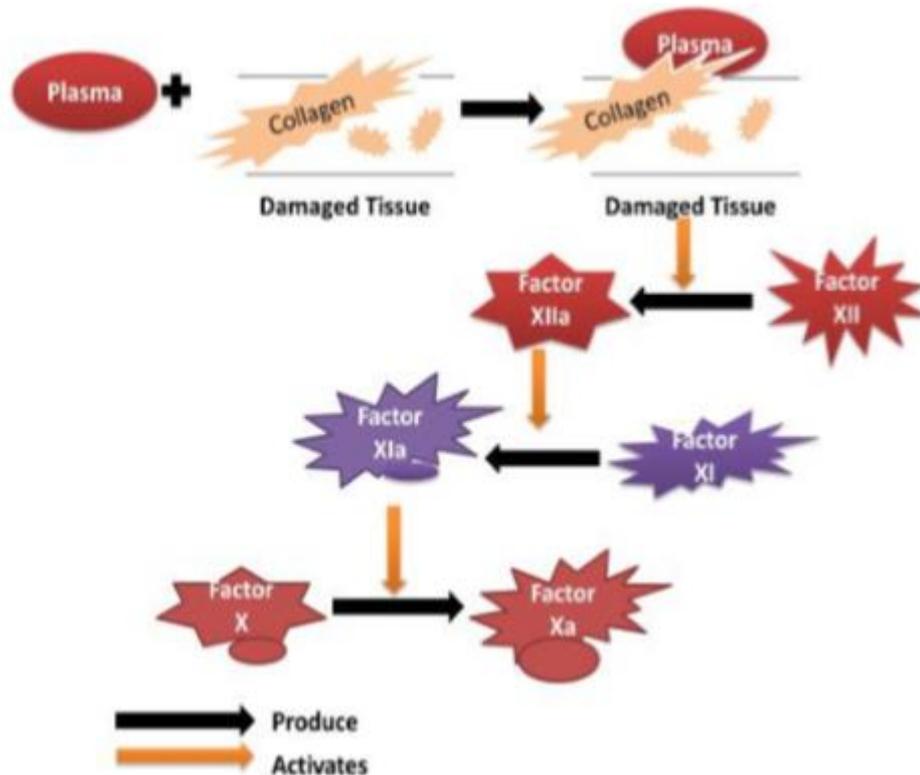
A via extrínseca inicia-se por uma glicoproteína transmembranar ausente em células que entram em contato com o plasma, essa proteína é denominada de fator tissular. Quando ocorrem lesões vasculares, as células que expressão o fator tissular ligado a membrana são expostas ao plasma. (DAHLBÄCK, 2000; NORRIS, 2003; GENTRY, 2004). Quando o fator tissular exposto no plasma interage com o fator VIIa circulante, ele se torna ativo para formar o complexo enzimático FT-VIIa. O fator VII é uma proteína plasmática dependente de vitamina K produzida no fígado (GENTRY, 2004). O complexo FT-VIIa na superfície celular apresenta dois substratos em potencial: o fator IX, o qual é convertido a fator IXa e o fator X, o qual é convertido a fator Xa (NORRIS, 2003). A conversão desses dois fatores (X e IX) em suas formas ativas pelo complexo FT-VIIa, necessita da participação de íons de cálcio. Em resumo, na via extrínseca, o fator VII será ativado pelo fator III liberado do tecido danificado, ativando o fator VII com o auxílio do cofator Ca^{2+} , originando o fator VIIa (Figura 2.4). As etapas que seguem à formação do fator Xa são idênticas para as vias extrínseca e intrínseca (BITHELL, 1993; RAVEL, 1997).

Figura 18 Representação esquemática da via extrínseca do sistema de coagulação sanguínea.



A via intrínseca se inicia pelo contato entre o sangue e determinada substância estranha, como o colágeno. Esse contato ocorre no interior dos vasos sanguíneos, resultante de uma lesão no revestimento do tecido vascular, em que o colágeno é exposto, seguido pela ativação do fator XII, o qual se torna mais hidrofóbico e adquire atividade enzimática. Resumidamente, a ativação do fator XI pelo fator XII liberado a partir de plaquetas induz a via intrínseca do sistema de coagulação do sangue, culminando na ativação do fator X (figura 2.5) (BITHELL, 1993; RAVEL, 1997; JIN; GOPINATH, 2016). O fator XIIa juntamente com o cininogênio de alto peso molecular (CAPM), convertem a proenzima précalicreína em calicreína, essa última converte mais fator XII para sua forma ativa (RAVEL, 1997). Com o fator XIIa, ocorre a conversão do fator XI inativo em forma ativa, que por sua vez transforma o fator IX na sua forma ativa. Quando o fator IX é ativado, pela via intrínseca ou pela via extrínseca, ocorre a formação de um complexo com o fator VIIIa, cálcio e fosfolipídeos, o qual ativa o fator X em Xa. Este complexo é essencial para a hemostasia (NORRIS, 2003). O fator Xa, juntamente com o fator Va (complexo protrombinase), convertem a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa) (JIN; GOPINATH, 2016).

Figura 19 Representação esquemática da via intrínseca do sistema de coagulação sanguínea.



2.1.5 Efeito dos polissacarídeos sulfatados na coagulação.

Uma bioatividade bastante reconhecida e estudada dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é o seu efeito na coagulação. Isso foi relatado pela primeira vez para polissacarídeo isolado de *F. vesiculosus* onde foi evidenciada a inibição da formação de coágulos de fibrina e atividade antitrombina (BERNARDI; SPRINGER, 1962). Desde então, estudos sobre polissacarídeos sulfatados de várias algas marinhas revelaram efeito na coagulação (POMIN; MOURÃO, 2008). A base para essas atividades não é completamente compreendida, mas várias investigações sugerem que há mais de um mecanismo de ação, incluindo a inibição direta e indireta da trombina através da ativação de inibidores de trombina (por exemplo, co-fator II de antitrombina e heparina) (MENSHOVA *et al.* 2003). Cumashi *et al.* (2007) relataram que polissacarídeos sulfatados de 10 algas marinhas prolongaram a coagulação tempo do plasma humano; no entanto, apenas cinco destes tiveram atividade significativa contra a agregação plaquetária induzida por trombina. Embora os resultados deste último ensaio sejam sugestivos de ação direta dos polissacarídeos sulfatados na trombina, os autores apontaram que uma ação interferente da ligação da trombina à seus receptores nas plaquetas não podem ser descartados.

As características estruturais gerais dos polissacarídeos sulfatados que são importantes em sua atividade anticoagulante incluem composição do açúcar, peso molecular, nível de sulfatação e posição dos grupos sulfato no açúcar coluna vertebral. Por exemplo, Nishino *et al.* (1991) descobriram que um maior conteúdo de fucose grupos sulfato e sulfato coincidiram com maior atividade anticoagulante em frações de polissacarídeos sulfatados de *E. kurome*. Eles também mostraram que a o efeito na coagulação dos polissacarídeos foi positivamente correlacionada com o teor de sulfato e que apenas polissacarídeos com uma razão de sulfato total por de resíduo de açúcar maior do que um possuíam atividade significativa. Chevolot *et al.* (2001) também relataram que localização do grupo sulfato nos resíduos de açúcar pode ser um fator que altere a atividade anticoagulante de um polissacarídeo sulfatado de alga marinha.

Também parece haver relação entre o peso molecular dos polissacarídeos sulfatados e seu efeito na coagulação. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas de maior peso molecular mostraram maior atividade anticoagulante que ao de menor peso molecular (~ 10 kDa) (NISHINO *et al.*, 1991). Pomin *et al.* (2008) relataram que o polissacarídeos sulfatado de algas matnhas de cadeia linear requeriam cadeias mais longas que os glicosaminas de mamíferos para obter atividade anticoagulante (POMIN; MOURÃO, 2008). A clivagem seletiva para reduzir o tamanho molecular de fucanas em reduziu drasticamente seu efeito na inativação da trombina mediada pelo cofator II da heparina. Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas de menor peso molecular parecem se ligar ao cofator II da heparina, mas, diferentemente da forma de comprimento toal, não foram capazes de efetivamente facilitar a interação do cofator II da heparina com trombina (POMIN; MOURÃO, 2008).

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antioxidante e anticoagulante do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Gracilaria intermedia* (GPi) com modificações estruturais.

2.2.2 Objetivos específicos

Determinar o efeito antioxidante de PGi, HPGi e SPGi através da capacidade antioxidante total (CAP).

Determinar a habilidade de sequestro do íon ferroso de PGi, HPGi e SPGi

Avaliar a capacidade de PGi, HPGi e SPGi no sequestro do radical DPPH.

Avaliar o efeito de PGi, HPGi e SPGi quanto a sua atividade anticoagulante *in vitro* através dos testes de TTPA e TP.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1 Capacidade antioxidante total

O ensaio de capacidade antioxidante total foi realizado pela formação do complexo fosfomolibdênio descrito anteriormente por Prietro, Pineda e Aguilar (1999). Inicialmente, 300 µL das amostras (PGi nativo; PGi sulfatado e PGi hidrolisado) foram adicionados a 3 mL da solução de molibdato de amônio (4 mmol/L), contendo ácido sulfúrico (0,6 mol/L) e fosfato de sódio (28 mmol/L). Os tubos foram homogeneizados e incubados a 95 °C por 90 minutos. Após o resfriamento, as absorvâncias foram analisadas a 695 nm. Ácido ascórbico (400 µg/mL) foi considerado como 100% de atividade antioxidante e o hidroxitolueno butilado (BHT) foi usado como controle. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e o branco foi realizado pela substituição da amostra pelo solvente utilizado. Os resultados são expressos em porcentagem da capacidade antioxidante total (CAP) e calculado usando a equação 1.

$$\text{CAP (\%)} = [(\text{ABS amostra} - \text{ABS branco}) / (\text{ABS ácido ascórbico} - \text{ABS branco})] \times 100 \quad (1)$$

2.3.2 Habilidade de quelação do íon ferroso

A habilidade de quelação do íon ferroso foi avaliada como descrito anteriormente por Chew *et al.*, (2008), com modificações. Nessa ordem, foram adicionados 1 mL de sulfato ferroso (FeSO₄; 0,1 mmol/L), 1 mL de amostra (PGi nativo; PGi sulfatado e PGi hidrolisado) e 1 mL de ferrozina (ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfônico; 0,25 mmol/L). Os tubos foram homogeneizados e mantidos por 10 minutos em temperatura ambiente, na seqüência as absorvâncias foram medidas a 562 nm. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e o EDTA foi usado como controle. Os resultados foram expressos em porcentagem como atividade de quelação do ferro (QF) e calculado usando a equação 2.

$$\text{QF(\%)} = [(\text{ABSbranco} - \text{ABSamostra}) / \text{ABSbranco}] \times 100 \quad (2)$$

2.3.3 Sequestro do radical DPPH

A capacidade de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foi realizado de acordo com o método descrito por Blois (1958), com modificações. Inicialmente, 300 µL de amostra (PGi nativo; PGi sulfatado e PGi hidrolisado) em todas as concentrações foram agitadas em 200 µL de metanol (MeOH). Então, 2,5 mL de DPPH (75 µmol/L em MeOH)

foram adicionados e as amostras foram mantidas no escuro em temperatura ambiente por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas a 517 nm. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e o BHT foi usado como controle. A atividade de sequestro do radical DPPH (%) foi calculado usando a equação 3.

$$\text{Atividade de sequestro de DPPH(\%)} = [A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100 \quad (3)$$

Em que, $A_0 = A_{517}$ do DPPH sem amostra; $A = A_{517}$ da amostra e DPPH; e $A_b = A_{517}$ da amostra sem DPPH.

2.3.4 Plasma humano

O sangue humano foi obtido de doadores saudáveis do Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e que não faziam uso de medicamentos. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 3,6 mL contendo citrato 3,2% (9 partes de sangue para 1 parte de citrato de sódio) e centrifugadas para obtenção do plasma, o qual foi utilizado nos protocolos experimentais de coagulação e agregação plaquetária. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução n.º 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil.

2.3.5 Aspectos éticos e legais

Para a obtenção do plasma humano, a pesquisa obedeceu aos princípios da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, assegurando aos sujeitos participantes o sigilo de suas identidades e garantia de participação voluntária, podendo afastar-se a qualquer momento da pesquisa e da doação do sangue sem qualquer ônus financeiro e/ou material ou prejuízo nas atividades. Os participantes foram orientados sobre os objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

2.3.6 Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

O teste de tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) foi realizado com PGI₁, SPGI₁ e HPGI₁, em triplicata, seguindo as recomendações do fabricante e analisados em coagulômetro (CLOTimer DRAKE, Brasil). Para realização do teste, utilizou-se plasma humano normal e heparina como controle positivo. Para o ensaio de TTPA, foram adicionados 10 µl do polissacarídeo (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), heparina (5 µg/mL) ou solução salina a 90 µl de plasma humano normal incubados a 37° C durante 1 min, sob agitação magnética.

Após a incubação, foi adicionado 100 µl de cefalina à mistura e incubado nas mesmas condições durante 3 min. A reação foi iniciada pela adição de 100 µl de CaCl₂ (0,25 M) e o tempo de coagulação foi avaliado. A atividade anticoagulante foi expressa em segundos, levando em consideração a relação entre o tempo de coagulação em presença (T₁) e ausência (T₀) de polissacarídeo ou heparina.

2.3.7 Tempo de protrombina

O teste de tempo de protrombina (TP), foi realizado com PGI, SPGI e HPGI em triplicata, seguindo as recomendações do fabricante (CLOTimer DRAKE, Brasil). Para realizar o teste, utilizou-se plasma humano normal e heparina como controle positivo. Para o ensaio de TP, foram adicionados 10 µl do polissacarídeo a (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) ou heparina (5 µg/mL) ou solução salina a 90 µl de plasma humano normal e incubou-se a 37 °C durante 5 minutos, sob agitação magnética. Após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição de 200 µl de tromboplastina e o tempo de coagulação foi avaliado. A atividade anticoagulante foi expressa em segundos, levando em consideração a relação entre o tempo de coagulação em presença (T₁) e ausência (T₀) de polissacarídeo ou heparina.

2.3.8 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± S.E.M e analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. Valores de p <0,05 foi definido como estatisticamente significativo.

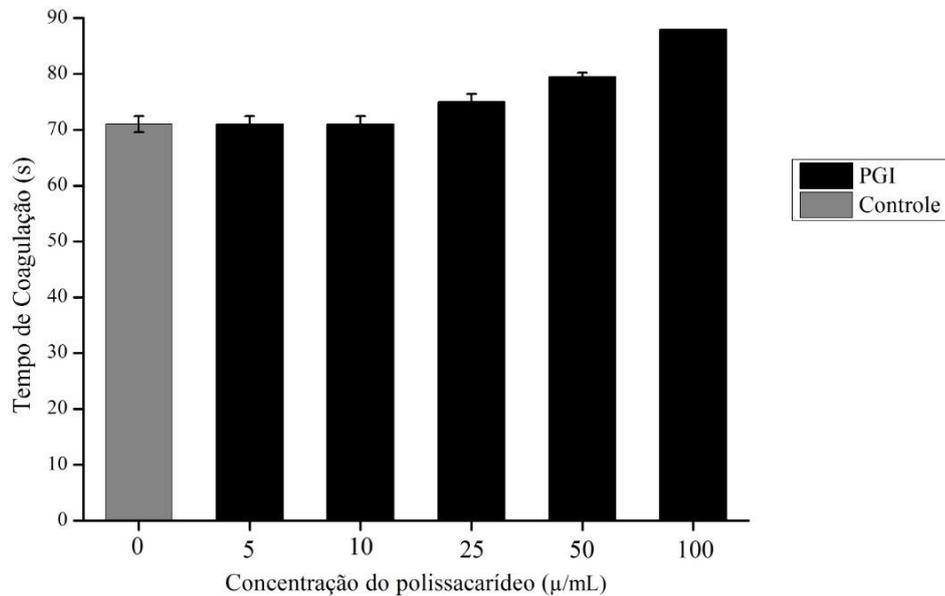
2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

A atividade anticoagulante pode ser determinada por ensaios funcionais específicos que analisam e monitoram a formação do coágulo sanguíneo (LEADLEY *et al.*, 2000). O teste do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) baseia-se na ativação do mecanismo intrínseco da coagulação sanguínea. A cefalina utilizada neste teste atua como um substituto plaquetário, sendo também necessário a adição de cálcio ao plasma a ser testado para a ativação da cascata (BOURIN; LINDAHL, 1993).

O tempo de coagulação sanguínea para o teste do TTPA após a adição dos PGI nas diferentes concentrações foi levemente prolongado em comparação ao controle (salina), mas apenas em altas concentrações (50 e 100) (Figura 2.6). Este aumento, entretanto, ficou longe do proporcionado pela heparina na concentração de 5µg/mL, onde o sangue não havia coagulado após 300 segundos. Estes resultados mostram que PGI nativo não apresenta efeito considerável na coagulação através da via intrínseca. Polissacarídeos sulfatados geralmente apresentam efeito na coagulação por apresentarem estrutura semelhante a heparina, neste caso os fucoidanos geralmente têm atividades anticoagulantes bem maiores que as de álgares, devido à sua semelhança estrutural com a heparina (NAGUMO; NISHINO, 2017). Outro fator a ser considerado é o relativo baixo grau de sulfatação do PGI nativo, pois a sulfatação confere à molécula cargas negativas, que podem interagir com as glicoproteínas da cascata de coagulação da via intrínseca (ZHAO *et al.*, 2016). O fato de haver uma maior quantidade de sulfato presente nas maiores concentrações pode explicar o leve aumento do tempo de coagulação nesses grupos.

Figura 20 Efeito de PGI nativo na coagulação avaliado pelo teste do TTPA.



SPGi, por sua vez, apresentou um efeito dose-dependente na coagulação. Em concentrações menores, o polissacarídeo acelerou levemente o tempo de coagulação, enquanto que nas maiores concentrações, apresentou um efeito anticoagulante ($p < 0,05$) (Figura 2.7). Normalmente, o teor de sulfato está correlacionado positivamente com a capacidade anticoagulante de um polissacarídeo, porém, polissacarídeos com menor tamanho de cadeia, tendem a ter menor efeito anticoagulante (NAGUMO; NISHINO, 2017). O fato do processo de sulfatação química poder reduzir o tamanho da cadeia do polissacarídeo pode explicar o menor tempo de coagulação nas menores concentrações em relação ao PGI nativo. A medida que as concentrações aumentam, a quantidade de sulfato presente no meio pode contrabalancear essa redução do tamanho da cadeia, o que explicaria o aumento do tempo de coagulação de SPGi. HPGi, por ser um polímero menor e não ter sido sulfatado quimicamente, não apresentou atividade anticoagulante em nenhuma concentração em relação ao controle (Figura 2.8).

Figura 21 Efeito de SPGi na coagulação avaliado pelo teste do TTPA.

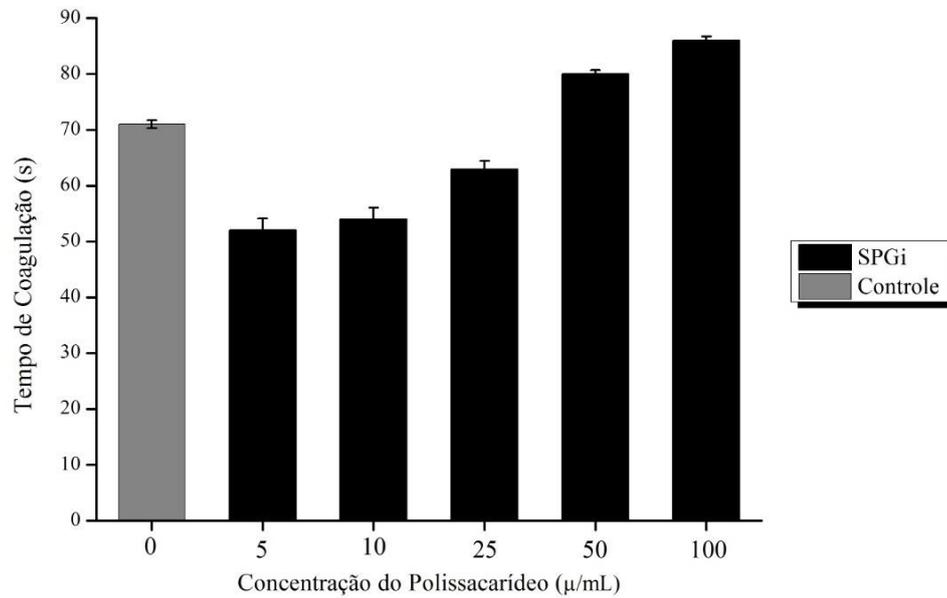
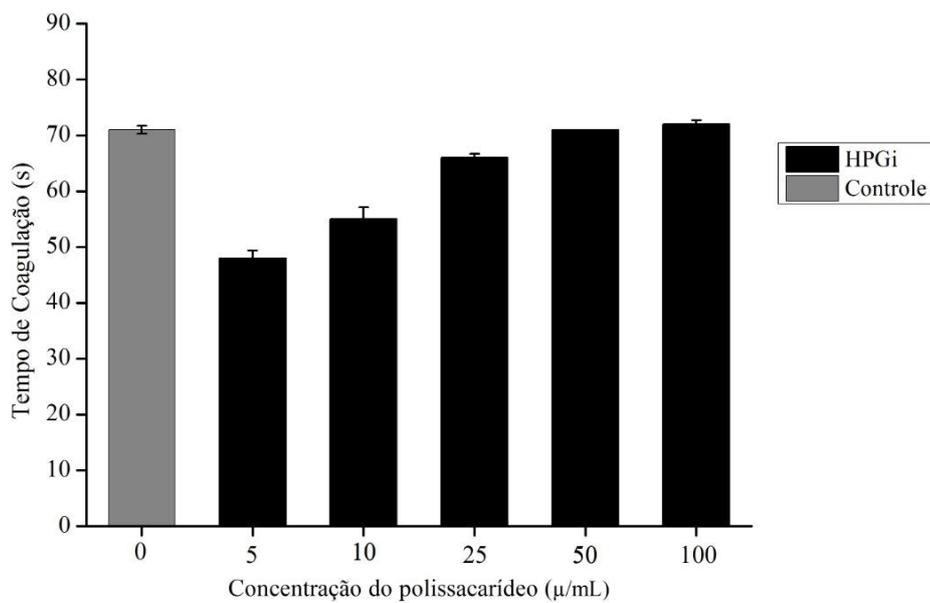


Figura 22 Efeito de HPGi na coagulação avaliado pelo teste do TTPA.



O potencial anticoagulante observado para os PGI foi menor do que os observados para os polissacarídeos sulfatados isolados da alga marinha *Enteromorpha linza* que prolongaram o tempo de coagulação um pouco mais do que duas vezes, na maior concentração testada (100 µg/mL) (WANG *et al.* 2010). A atividade anticoagulante é bem descrita para polissacarídeos de algas marinhas, especialmente para polissacarídeos obtidos a partir de algas vermelhas (Pereira *et al.*, 2005; Pereira, Melo, Mourão, 2002; Quinderé *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2017). Moléculas que não afetam ou afetam ligeiramente a cascata de coagulação apresentam potencial para serem utilizadas em diversas atividades biológicas, especialmente atividades farmacológicas como cicatrizante onde grandes alterações na cascata de coagulação causam interferências no processo (HOFFMAN, 2006).

2.4.2 Tempo de protrombina

O teste do tempo de protrombina (TP) investiga o sistema extrínseco da coagulação, permitindo revelar deficiências dos fatores que fazem parte deste sistema (LIMA *et al.*, 1992). Nenhum dos polissacarídeos testados apresentou efeito sobre o teste de TP, mostrando que não apresentam ação sobre o sistema extrínseco de coagulação. Moléculas que afetam apenas uma via da coagulação podem ser interessantes anticoagulantes, por apresentarem especificidade, podem ser utilizados em situações onde há o interesse de se afetar apenas uma via. Este fato é comum e ocorre com polissacarídeos sulfatados de diversas algas. Por exemplo, os polissacarídeos sulfatados isolados de *G. Acerosa*, outra alga marinha vermelha produtora àgar, apresentaram efeito no teste de TTPA, mas não apresentam potencial anticoagulante evidenciados no teste de TP (LI *et al.*, 2017; WIJESEKARA, PANGESTUTI, KIM 2011).

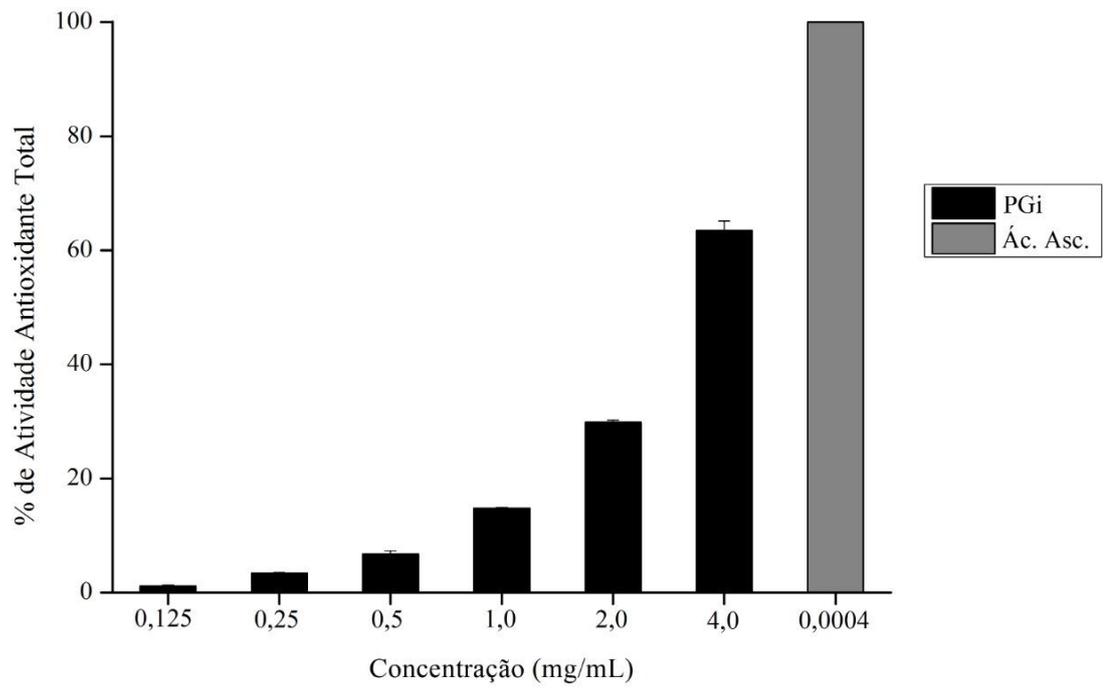
2.4.3 Capacidade antioxidante total

Os radicais livres desempenham um papel central na deterioração dos produtos alimentares, levando a sabores indesejados, mudanças de cor e perda de qualidade nutricional (AFSHARI; SAYYED-ALANGI, 2016; NGO *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2001; RODIL *et al.*, 2010). Além disso, podem causar vários problemas à saúde humana (BUTTERFIELD *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2003; NAMVAR *et al.*, 2013; SITI; KAMISAH; KAMISIAH, 2015). Analisando o comportamento reológico e o potencial uso industrial do PGI nas indústrias de alimentos, foi realizado o efeito antioxidante desse polímero. Entre os antioxidantes sintéticos mais comumente usados na indústria de alimentos estão o butilado de hidroxitolueno (BHT) e

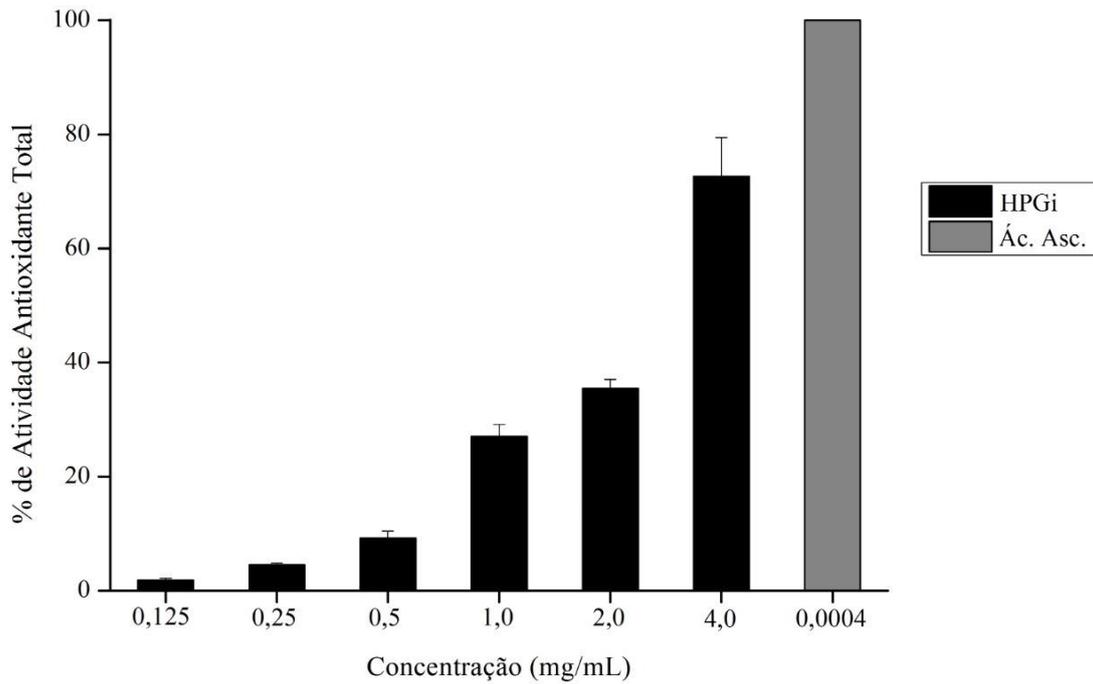
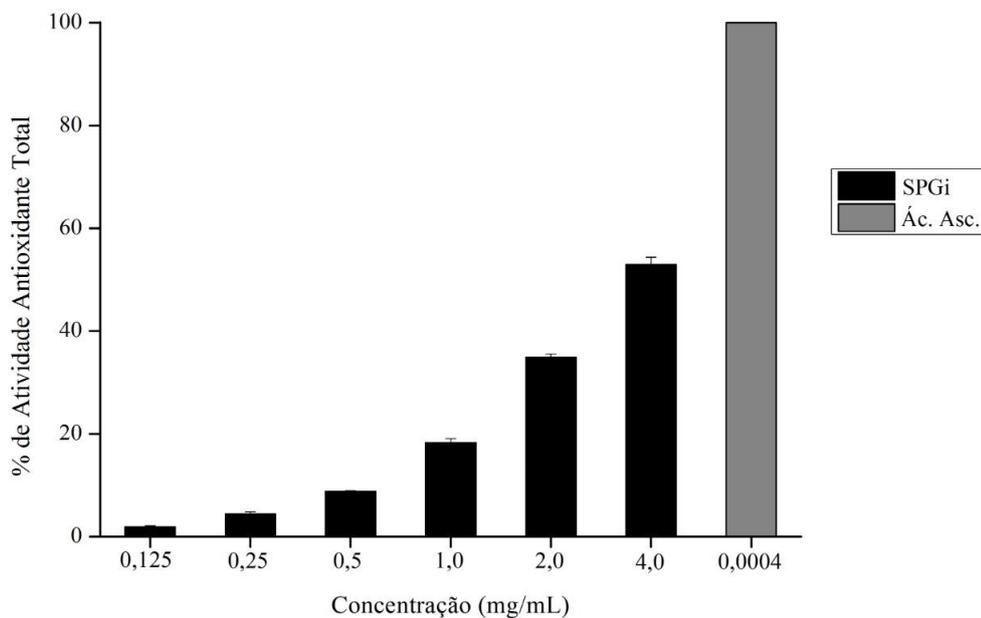
o butilado de hidroxianisol (BHA), a fim de prolongar a vida útil dos produtos (CAROCHO; FERREIRA, 2013; RODIL *et al.*, 2010). No entanto, estes compostos estão associados a vários efeitos nocivos a saúde, tais como: citotoxicidade (THOMPSON; MOLDÉUS, 1988; SAITO; SAKAGAMI; FUJISAWA, 2003) e câncer (CLAYSON *et al.*, 1990; PETERS *et al.*, 1996; SAKAI-MIYATA; TAKAHASHI, 1990). Portanto, o interesse por antioxidantes de fontes naturais com propriedades viscoelásticas com menor risco à saúde cresce consideravelmente na atualidade.

Burg & Oshrat (2015) sugeriram que cátions no meio podem interagir com as cadeias dos polissacarídeos sulfatados e alterar sua conformação estrutural tridimensional, reduzindo assim a repulsão eletrostática de cadeias intermoleculares, tornando os sítios na molécula com propriedades antioxidantes expostos, aumentando assim o potencial antioxidante. Nessa linha de raciocínio, o potencial antioxidante do PGI foi avaliado na forma nativa e hidrolisada.

Os resultados da capacidade antioxidante total do PGI são mostrados na Figura 2.9. O efeito antioxidante na redução de molibdato aumentou proporcionalmente de acordo com a concentração crescente do polissacarídeo sulfatado. A capacidade antioxidante total do PGI teve efeito máximo na concentração de 4 mg/mL ($60,7 \pm 4,9\%$). No entanto, com a hidrólise, a redução do molibdato do PGI a 4 mg/mL aumentou significativamente ($p < 0,05$) para $72,6 \pm 0,27\%$, (Figura 2.10) isso pode ser explicado devido ao fato do processo de hidrólise enzimática criar um número maior de cadeias de tamanho menor, aumentando assim a quantidade extremidades redutoras presentes, o que aumenta atividade antioxidante da molécula. SPGI por sua vez, apresentou uma redução da capacidade antioxidante total em comparação com SPGI nativo ($p < 0,05$)(Figura 2.11), com uma capacidade de 53% na concentração de 4 mg/mL. Wang *et al.* (2019), também trabalhando com um polissacarídeo sulfatado quimicamente, notaram uma diminuição da atividade antioxidante total em comparação com a forma nativa, isto pode ocorrer devido ao fato do processo de sulfatação deslocar os grupos hidroxila presentes na molécula, diminuindo seu poder redutor (LI *et al.*, 1996).

Figura 23 - Capacidade antioxidante total do PGI nativo

Valores expressos como média \pm DP (n = 3) #p ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

Figura 24 - Capacidade antioxidante total do HPGi**Figura 25** - Capacidade antioxidante total do SPGi

A capacidade antioxidante total do PGI foi avaliada pela formação do complexo fosfomolibdênio, após redução do molibdênio (Mo^{6+} a Mo^{5+}) pelo agente redutor (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). O PGI e HPGi mostraram ser excelentes agentes redutores para o molibdênio. O molibdênio é um nutriente essencial encontrado em plantas e animais,

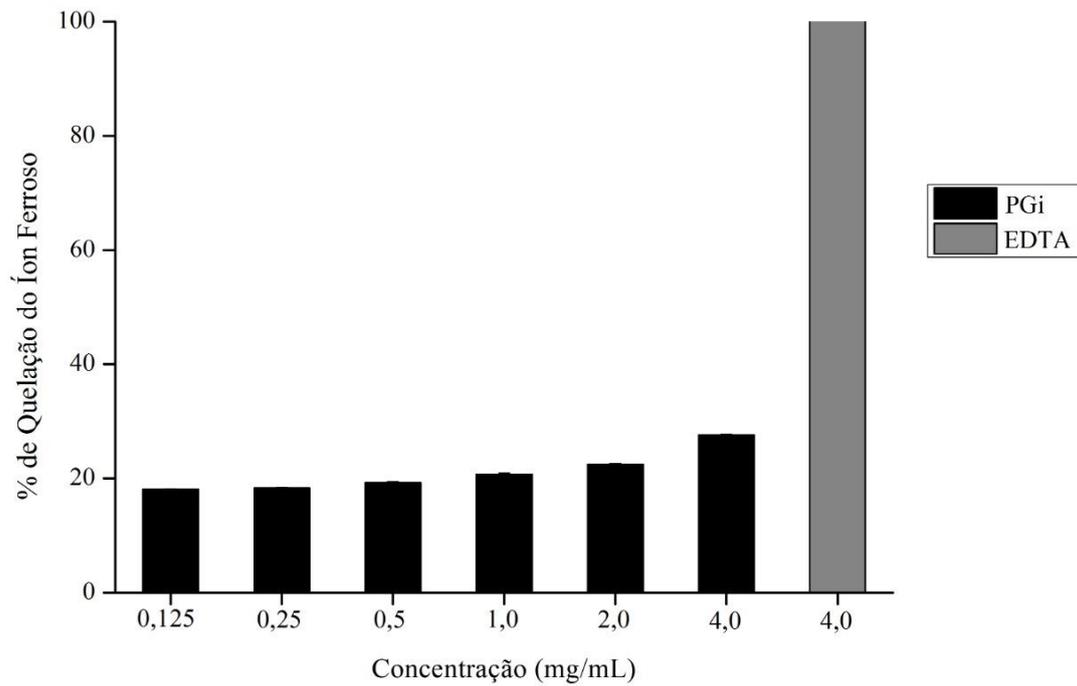
atuando como co-fator de enzimas redox, como xantina oxidase e aldeído oxidase; no entanto, pode ser prejudicial em altas concentrações (BERTONI *et al.*, 2015; KISKER; SCHINDELIN; REES, 1997). Fontes de molibdênio hexavalente (Mo^{6+}), como o molibdato de sódio, são altamente consumidas em países desenvolvidos, tendo como fator de toxicidade a disponibilidade de cobre em sistemas biológicos, levando a várias complicações, principalmente com distúrbios de infertilidade (MURRAY *et al.*, 2014; TURNLUND; FRIBERG, 2007) e mecanismos apoptóticos em células do baço (GU *et al.*, 2015).

2.4.4 Habilidade de quelação do íon ferroso

Os resultados da quelação de íons ferrosos são mostrados na Figura 2.12. O PGI obteve um melhor efeito na quelação de íons ferrosos na concentração de 4 mg/mL ($27,35 \pm 0,31\%$) e houve pouca alteração da habilidade de quelação do íon ferroso em relação à concentração. No entanto, com a hidrólise, o efeito do PGI aumentou consideravelmente ($p < 0,05$) chegando a $74,97 \pm 3,11\%$ na concentração de 4 mg/mL (Figura 2.13). SPPGI também apresentou um aumento da habilidade de quelação do íon ferroso em comparação com o PGI nativo ($p < 0,05$), chegando a $77,9 \pm 1,91\%$ na concentração de 4 mg/mL (Figura 2.14), similar aos valores obtidos por HPGI. Isto indica que as modificações químicas foram eficientes para o aumento desta capacidade antioxidante da molécula. O EDTA na dose de 2 mg/mL foi utilizado como controle.

Outro importante radical é o ferro, um mineral que participa em diversos processos biológicos, como o transporte de oxigênio (DIAS *et al.*, 2017) e cof-ator no metabolismo de proteínas e DNA (PANTOPOULOS *et al.*, 2012). Entretanto, o excesso desse metal o torna altamente reativo e pode atuar como um pró-oxidante da peroxidação lipídica, que ocorre de acordo com a reação de Fenton (CHUN-HUI *et al.*, 2007).

Figura 26 - Habilidade de quelação do íon ferroso do PGi nativo.



Valores expressos como média \pm DP (n = 3) § p <0,001 vs GcP. ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

Figura 27 - Habilidade de quelação do íon ferroso do HPGi.

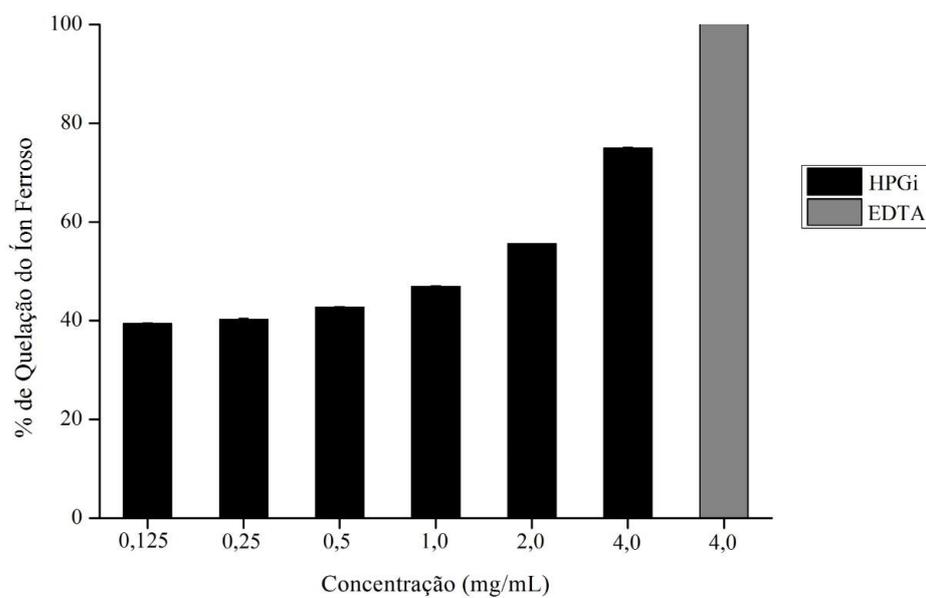
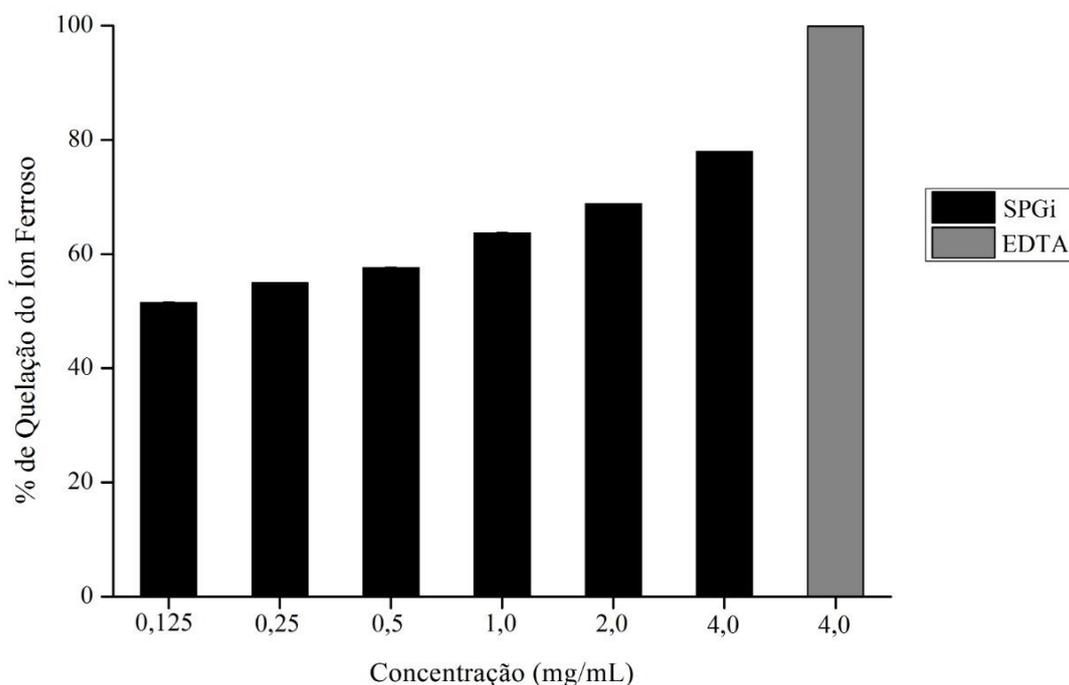
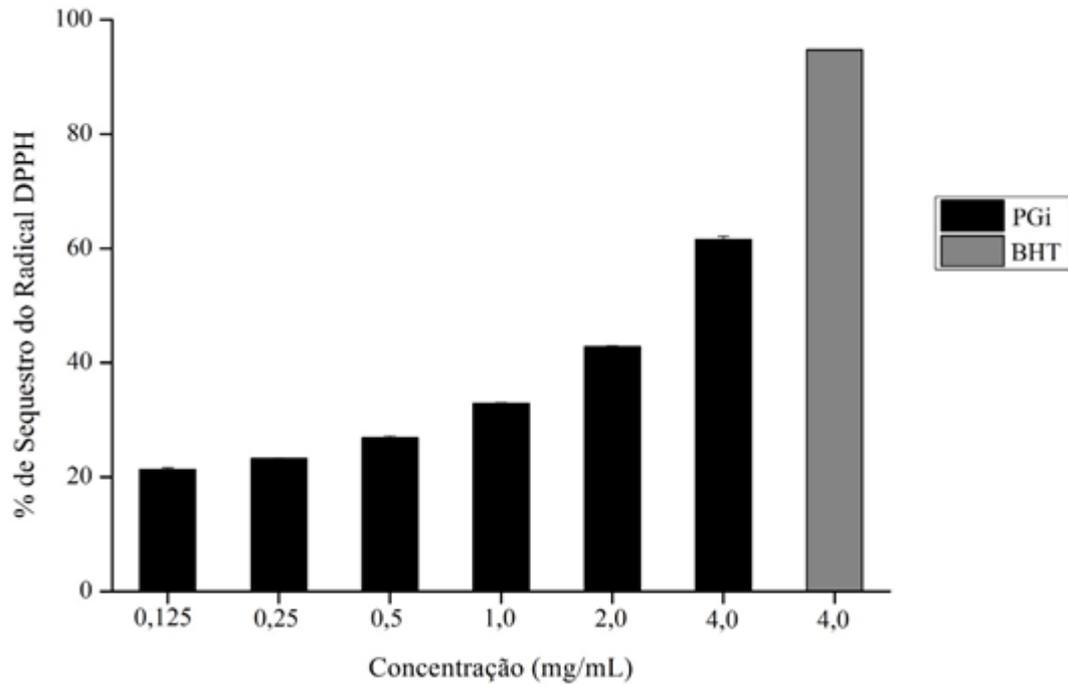


Figura 28 - Habilidade de quelação do íon ferroso do SPGi.

2.4.5 Sequestro do radical DPPH

A capacidade de eliminação do radical DPPH pelo PGI é mostrada na Figura 2.15. PGI demonstrou boa capacidade antioxidante nesse teste, chegando a 61% na concentração de 4 mg/mL. HPGi, por sua vez, apresentou maiores de atividade antioxidante desde as concentrações mais baixas, e apresentou um valor maior do que o de PGI nativo na concentração de 4 mg/mL (64%) (Figura 2.16). SPGi, em comparação, apresentou um valor inferior de atividade de sequestro do radical DPPH, com um máximo de 41% na concentração de 4 mg/mL ($p < 0,05$) (Figura 2.17). O BHT a 4 mg/mL foi utilizados como controle.

Figura 29 - Efeito no sequestro do radical DPPH do PGI nativo.



Valores expressos como média \pm DP (n = 3) #p < 0,001 ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni.

Figura. 30 - Efeito no sequestro do radical DPPH do PGI hidrolisado.

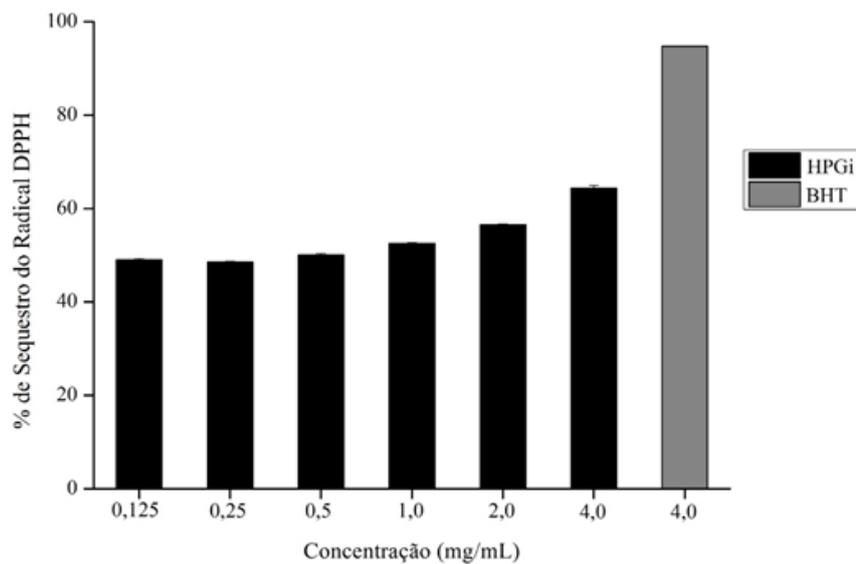
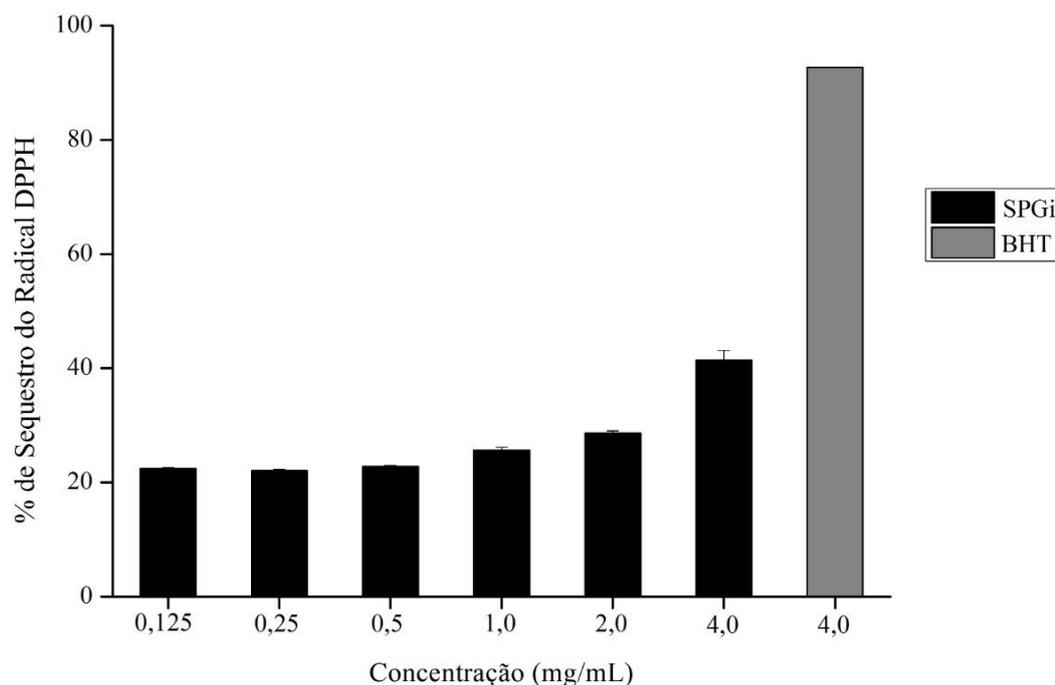


Figura 31 - Efeito no sequestro do radical DPPH do PGI sulfatado.

Dentre os testes realizados, o PGI apresentou uma relativa baixa atividade antioxidante na eliminação do radical DPPH, mas esses dados são consistentes com a literatura sobre os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas no sequestro desses radicais livres (SOUSA *et al.*; 2016; SOUZA *et al.*, 2012; ANAND *et al.*, 2018). Também é importante notar que os valores obtidos foram maiores que os obtidos por Castro *et al.*, (2018) para a mesma alga. Isto pode ter ocorrido devido à variações sazonais ou regionais da composição dos polissacarídeos. A atividade sequestradora de DPPH tem sido amplamente utilizada para quantificar a atividade antioxidante de muitos compostos, como polissacarídeos de sulfato de algas marinhas. Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995) sugerem que a interação de um antioxidante com o DPPH depende de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxila disponíveis na molécula. Os polissacarídeos sulfatados apresentam hidroxilas livres em sua estrutura química, o que favorece a abstração dos átomos de hidrogênio, permutando os elétrons ou átomos ao radical livre, reduzindo-o desta forma (MENSOR *et al.*, 2001).

2.5 Conclusão

Em conclusão, os PGI, HPGi e SPGi apresentaram leve efeito sobre a via intrínseca da cascata de coagulação, apresentando potencial para serem utilizadas em diversas atividades biológicas, especialmente atividades farmacológicas como cicatrizante onde grandes alterações na cascata de coagulação causam interferências no processo. Além disso, apresentaram boa atividade antioxidante, o que mostra um potencial para ser usado especialmente para aplicação na indústria alimentícia onde a atividade antioxidante é um requisito obrigatório, além de ser um substituto para compostos tóxicos como BHT e BHA.

3 CAPITULO III: POTENCIAL CICATRIZANTE DO POLISSACARÍDEO DE

Gracilaria intermedia

3.1 Introdução

3.1.1 Tratamento de feridas cutâneas

O tratamento de feridas cutâneas constitui um problema de saúde pública no mundo inteiro, especialmente devido aos custos cada vez maiores associados aos tratamentos (SERENA, 2014). Estes gastos alimentam um crescente mercado constituído por diversos produtos cicatrizantes sintéticos e biológicos, que atualmente movimentam 12 bilhões de dólares anuais, com previsão de aumento para 18,5 bilhões de dólares em 2021 (MEDMARKET DILIGENCE, 2016). Essa tendência é uma decorrência natural do aumento da parcela de indivíduos idosos na população mundial, e diversos países, como Estados Unidos e Inglaterra, já consideram a redução destes custos uma prioridade (SEN *et al.* 2009). Em relação ao Brasil, pesquisas ou dados oficiais em relação aos gastos orçamentários para o tratamento de feridas são raros, mas estima-se que as dificuldades de cicatrização atinjam 1-2% da população em geral, com a alocação de 2% do orçamento em Saúde para o tratamento de feridas, um número que tende a aumentar bastante com o crescente envelhecimento da população brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE: BRASIL, 2002).

Esse cenário gera uma grande demanda por novos processos e produtos que reduzam os custos associados ao tratamento de feridas, com destaque para a busca por produtos curativos mais eficientes e com maior custo-benefício (MAESSEN-VISCH; VAN MONTFRANS, 2016). Curativos tradicionais, como gaze e algodão, não provêm o ambiente úmido necessário para uma cicatrização mais rápida, pois permitem a evaporação de líquidos presentes na ferida. Além disso, não proporcionam o isolamento adequado da ferida contra agentes infecciosos e precisam ser trocados constantemente para evitar danos teciduais, aumentando o tempo de tratamento e custos associados (BOATENG *et al.*, 2008; HARDING; CUTTING; PRICE, 2000). Portanto, a tendência atual na indústria de produtos cicatrizantes é o desenvolvimento de curativos modernos: produtos que possam ser utilizados como alternativa aos curativos tradicionais (MAESSEN-VISCH; VAN MONTFRANS, 2016).

3.1.2 Curativos modernos

A característica essencial dos curativos modernos é a capacidade de criar e manter um ambiente úmido no local da ferida. A sua classificação se baseia principalmente nos

biomateriais a partir dos quais eles são produzidos e geralmente eles se apresentam como formulações tópicas preparadas como soluções líquidas (suspensões e emulsões) ou semissólidas (hidrogéis e cremes). Além disso, diversos compostos e moléculas podem ser incorporados a esta base da formulação como intuito de melhorar suas atividades biológicas (BOATENG *et al.* 2008, OUSEY; CUTTING, 2016).

Um aspecto importante para os curativos modernos é a capacidade de potencializar as fases do processo de cicatrização de feridas. Este processo é bastante complexo e envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular, cujo objetivo é reparar o tecido. Os eventos celulares e bioquímicos envolvidos são comumente divididos em três estágios descritos como inflamação, formação do tecido de granulação e deposição da matriz extracelular e remodelação. Tais eventos estão extremamente superpostos e não podem ser separados completamente um do outro (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

3.1.3 Hidrogéis

Tendo em vista as características necessárias para um produto cicatrizante de qualidade, os hidrogéis, em particular, aparecem como uma opção bastante atrativa. Estes compostos podem ser definidos como sendo um material polimérico com capacidade de reter uma quantidade significativa de água em sua estrutura (AHMED 2013). Assim, são recomendados para aplicação tópica na limpeza de feridas secas, com crosta ou escaras e inclusive já existe uma gama de hidrogéis cicatrizantes disponíveis comercialmente como o Nu-gel[®] (Johnson & Johnson, Ascot, UK) e Purilon[®] (Coloplast). Hidrogéis apresentam diversas características interessantes para o processo de cicatrização: não são muito reativos com o tecido biológico, são permeáveis aos metabólitos, não provocam irritação, não são aderentes, promovem a cicatrização em ambiente úmido, não deixam resíduos, melhoram a reepitelização de tecidos e são adequados para utilização em todas as fases da cicatrização (WITCHERLE, 1960, FREHNER; WATTS, 2016).

Considerando-se estas qualidades, há uma grande procura por compostos formadores de hidrogéis para serem utilizados como agentes cicatrizantes e os hidrocolóides são uma classe de materiais bastante indicada para essa finalidade. Em cicatrização, hidrocolóides são produtos obtidos de materiais coloidais (formadores de gel) em combinação com outros materiais como plastificantes ou adesivos e diversos estudos já demonstraram a eficácia dos hidrocolóides como base para géis cicatrizantes (JIN *et al.*, 2016). No Brasil, compostos formadores de gel tipicamente utilizados para este fim em produtos comerciais e em farmácias de manipulação incluem com base moléculas proteicas ou polissacarídicas como o CMC

(carboximetilcelulose), gelatina e pectina (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos capazes de absorver grandes quantidades de água (HOFFMAN, 2012). Esses géis podem ter muitas aplicações, com destaque para as biomédicas, como a produção de lentes de contato, sistemas de liberação de fármacos, engenharia de tecidos, produtos de higiene e curativos (CALÓ & KHUTORYANSKIY, 2015). Diversas características gerais dos hidrogéis contribuem para essas aplicações, como biocompatibilidade devido à semelhança com os tecidos naturais, boa taxa de transporte de nutrientes e a capacidade de promover a liberação controlada de drogas e de protegê-las de ambientes hostis (QIU & PARK, 2001; FERNÁNDEZ-BARBERO *et al.*, 2009; HOFFMAN, 2012).

Muitos polímeros, naturais ou sintéticos, podem ser utilizados para a produção de hidrogéis (HOFFMAN, 2012). Recentemente, a aplicação de polímeros biorrenováveis tem sido o foco de muitas pesquisas, principalmente devido às suas vantagens como baixo custo e biodegradabilidade (THAKUR & THAKUR, 2015). Dentre os biopolímeros que podem ser utilizados para a produção de hidrogéis, encontram-se os polissacarídeos. De forma geral, essas moléculas não apresentam toxicidade e possuem um baixo custo de produção em comparação com outros polímeros, como o colágeno (VENUGOPAL; RAMAKRISHNA, 2005, AMINABHAVI, 2015). Um grupo de polissacarídeos que se destaca para esta finalidade são os álgares.

Estes compostos apresentam diversas vantagens em relação a outras macromoléculas em relação ao seu uso como cicatrizantes. Em geral, polissacarídeos mostram boas propriedades de hemocompatibilidade, são atóxicos e, com poucas exceções, têm baixo custo de produção em comparação com outros biopolímeros como o colágeno (VENUGOPAL; RAMAKRISHNA, 2005, AMINABHAVI, 2015). Além disso várias classes de polissacarídeos apresentam a capacidade de formar géis em altas concentrações, tornando-os atrativos para uso como produtos cicatrizantes (CASCONI *et al.*, 2001).

3.1.4 Cicatrização

A primeira fase do processo de cicatrização inicia-se no exato momento da lesão evoluindo para hemostasia, resultando na formação de um coágulo de fibrina, e migração de leucócitos fagocitários, os quais removerão as substâncias não-reconhecidas e microrganismos. Esta fase é caracterizada por uma resposta inflamatória, moléculas com a capacidade de modular essa fase despertam interesse da indústria para a formulação de

fármacos com capacidade cicatrizante. Galactomananas extraídas de *Caesalpinia pulcherrima* apresentaram atividade contra inflamação hidrogéis formados com esse polissacarídeo aumentaram a velocidade de cicatrização nos primeiros dias em camundongos (SOUSA *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2019).

Já a segunda envolve três eventos importantes que sucedem o período de maior atividade da fase inflamatória: neoangiogênese, fibroplasia e epitelização. Na terceira fase ocorre maturação da ferida e tem início durante a terceira semana. Caracteriza-se por um aumento da resistência, sem aumento na quantidade de colágeno (MORGADO; AGUIAR-RICARDO; CORREIA, 2015). Portanto, um produto cicatrizante que apresente a capacidade de auxiliar alguma fase do processo de cicatrização se torna bastante atrativo.

Também é importante selecionar o produto cicatrizante adequado para o tipo de ferida. Com base na natureza do processo de reparação, as feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas. Feridas agudas são geralmente lesões dos tecidos que curam completamente e com cicatrizes mínima entre 8-12 semanas (PERCIVAL, 2002). Essa categoria compreende tanto feridas causadas por agentes mecânicos quanto feridas provocadas por queimaduras e lesões químicas (NARADZAY; ALSON, 2005). Feridas crônicas, por outro lado surgem de lesões dos tecidos que não curam após 12 semanas. Estas feridas são resultados de perturbações na ordem das etapas do processo de cicatrização de feridas (MOORE *et al.*, 2006).

As feridas também podem ser classificadas com base no número de camadas e área de pele afetada. Injúrias que afetam apenas a superfície epidérmica são classificadas como ferimentos superficiais, enquanto lesões envolvendo tanto a epiderme quanto camadas dérmicas mais profundas, incluindo os vasos sanguíneos, suor glândulas e folículos pilosos são referidas como feridas de pequena profundidade e as feridas de grande profundidade ocorrem quando a gordura subcutânea ou tecidos mais profundos são afetados. Cada tipo de ferida tem diferentes necessidades no período tratamento e o composto curativo escolhido deve apresentar características específicas capazes de sanar esses problemas (KRASNER *et al.*, 1993; BOLTON; VAN RIJSWIJK, 1992).

3.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Formular um hidrogel a base de polissacarídeos sulfatados da alga *Gracilaria intermedia* e determinar o seu efeito cicatrizante em modelos de feridas limpas induzidas em camundongos.

3.2.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento de patentes para verificar a viabilidade da pesquisa em relação à formulação de um produto.
- Determinar a citotoxicidade dos polissacarídeos;
- Formular um gel a partir dos polissacarídeos isolados;
- Determinar efeito cicatrizante do gel em modelo de feridas limpas induzidas em camundongos através de visualização morfológica e dosagens bioquímicas.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Prospecção de patentes

A prospecção foi realizada no banco de dados da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (World Intellectual Property Organization - WIPO) e do Escritório Europeu de Patentes (European Patent Office - Espacenet), no período de junho de 2018. O termo utilizado para a busca foi “Agar” seguido do conectivo and e a palavra “Hydrogel”. O campo de aplicação selecionado foi front page para a WIPO e title or abstract para a Espacenet. Foram selecionados produtos que possuam hidrogéis a base de ágar e estes foram classificados quanto ao ano de publicação, o país de publicação e a Classificação Internacional de Patentes (CIP).

3.3.2 Isolamento de Polimorfonucleares

Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90 %) foram obtidos de sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará – HEMOCE (buffy coat) e isolados de acordo com o método descrito por Lucisano & Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e o soro lavado diversas vezes com soluções salina, utilizando solução de gelatina 2,5% (p/v) para formar um gradiente de separação dos componentes sanguíneos. Depois de isolados, os neutrófilos foram mantidos no meio HBSS (Hanks balanced salt solution) em gelo.

3.3.3 Avaliação da Citotoxicidade

Os ensaios in vitro podem ser empregados na avaliação preliminar da segurança de várias substâncias. Os parâmetros utilizados para a avaliação de citotoxicidade no presente estudos basearam-se na atividade metabólica da célula (teste d MTT).

Neutrófilos humanos (5×10^6 células/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C na presença de concentrações crescentes de *Gracilaria intermedia* (5, 10, 25, 50, 100 µg/mL), Controle (Veículo - Água destilada), HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% v/v – padrão citotóxico) em placa de 96 poços. Decorrido esse período, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos a 25°C e o sobrenadante descartado e a placa incubada com uma nova solução contendo MTT, na concentração de 3 mg/mL, essas células foram então incubadas novamente por mais 3 horas. Por fim, a placa foi centrifugada novamente nas

mesmas condições acima, o sobrenadante foi descartado e adicionado DMSO puro para a lise das células e solubilização do sal de formazan (MOSMANN, 1983). Neste instante, as placas foram agitadas durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 550 nm. A viabilidade celular foi expressa através do valor percentual em relação ao grupo controle.

3.3.4 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL) foi pré-incubada durante 15 min a 37°C com concentrações crescentes de *Gracilaria intermedia* (5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), Controle (água destilada - veículo), Indometacina (INDO – 36 $\mu\text{g/mL}$) ou HBSS (células não tratadas). A seguir, foi adicionado PMA (0,1 μM) e manteve-se por mais 15 min a 37°C . As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas pela degranulação leucocitária, foi utilizado na determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO) segundo metodologia descrita por Úbeda *et al.* (2002). Os resultados foram expressos como percentual de liberação de mieloperoxidase.

3.3.5 Formulação do hidrogel cicatrizante

Para a atividade cicatrizante, foi formulado um hidrogel através da complexação de PGI com outro material. A complexação com outro material foi escolhida com o intuito da geração de uma futura patente. Para isto, o material escolhido para complexação foi o galactomanano extraído de *Caesalpinia pulcherrima*, pois este polissacarídeo já apresentou capacidades anti-inflamatória, é capaz de formar hidrogéis e já foi demonstrada sua capacidade de auxiliar no processo de cicatrização (SOUSA *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2019). Inicialmente foi realizada a extração do galactomanano, de acordo com Cerqueira *et al.*, (2008). As sementes de *C. pulcherrima* foram moídas e, após a separação manual dos endospermas do cotilédone e da casca, estes foram imersos em etanol a 96% em ebulição por 10 minutos para desativar as enzimas. Os endospermas foram mantidos em água destilada (p/v, 1:5) a 7°C *overnight*, e em seguida foram adicionados dez volumes de água a 500 rpm para obter uma solução viscosa. Após filtração em rede de nylon (poros de 180 μm), o galactomanano foi precipitado pela adição de dois volumes de 96% etanol, coletado e disperso em acetona (1:5, p/v) por 15 minutos, seguido de secagem. O pó obtido foi suspenso em água (1:100, p/v) e precipitado com etanol novamente antes da moagem e peneiração do polissacarídeo purificado (malha de 0,125 mm). O hidrogel foi formulado de acordo com

SOUSA *et al.*, (2019), com modificações. Uma solução a 1,5% (p/v) de galactomanana de *C. pulcherrima* e PGI (1:1) em NaCl 0,15 M foi preparada em um homogeneizador Turratec TE102 por 10 min a 18.000 rpm, após o qual 0,1% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi adicionado para impedir crescimento microbológico. O hidrogel foi depois centrifugado por 30 min a 10.000 xg a 4 °C para remover materiais insolúveis e refrigerado até o uso.

3.3.6 Propriedades reológicas do gel

Para se avaliar as propriedades reológicas do gel, os ensaios reológicos foram realizados em reômetro modelo AR 550 da TA Instruments utilizando geometria do tipo cone e placa de 20 mm de diâmetro e sistema Peltier para controle da temperatura. As análises de fluxo foram realizadas variando a taxa de cisalhamento de 30 a 1000 s⁻¹ em duas diferentes temperaturas, 25 e 37 °C. As curvas de fluxo foram analisadas aplicando o modelo Herschel-Bulkley utilizando o programa Data Analysis da TA Instruments. Também foi realizada rampa de temperatura de 15 a 50 °C, com taxa de cisalhamento fixada em 0,1 s⁻¹. A análise oscilatória foi realizada variando a frequência de 0,1 a 5 Hz, e tensão fixada em 5 Pa, valor de tensão dentro da faixa de viscoelasticidade linear determinada por ensaio de varredura de tensão.

3.3.7 Atividade cicatrizante

Foram utilizados 60 camundongos albinos *Swiss* fêmeas (8 semanas, 25 ± 3 g) para a realização dos ensaios de cicatrização em modelo de feridas limpas induzidas em camundongos. Os animais foram fornecidos pelo Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza, separados em caixas limpas individuais de propileno, sob condições adequadas de luz (fotoperíodo – 12 h de luz), temperatura (25 °C), cama de maravalha e acesso a ração e água ad libitum. Os ensaios realizados seguiram os princípios éticos, a biossegurança e o respeito à experimentação animal descritos no *Guide for care and use of laboratory animals* (National Institutes of Health, Bethesda, md) e foram conduzidos de acordo com as resoluções normativas do conselho nacional de controle de experimentação animal - CONCEA, tendo em vista o disposto na lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, a qual estabelece os procedimentos para o uso científico de animais no Brasil. Os procedimentos envolvendo o uso de animais de laboratório foram submetidos e aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Universidade de Fortaleza.

3.8 Aplicação do gel em feridas limpas induzidas em camundongos

Para avaliação do efeito cicatrizante do gel *in vivo*, inicialmente, 60 camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal através de injeção intraperitoneal (IP) de cetamina e xilazina 115 e 10 mg/kg, respectivamente, utilizando-se uma seringa de insulina de 1 mL (CLARKE, 2013). Em seguida, os animais foram submetidos a tricotomia da região dorsal e antissepsia utilizando-se álcool iodado 0,15%. O modelo experimental se deu por cicatrização por segunda intenção com a produção de feridas excisionais induzidas na superfície dorsal dos animais utilizando punch cirúrgico de (10mm de diâmetro), no centro da área depilada, a ressecção foi feita com tesoura de pontas e uma pinça e em seguida o fragmento da pele foi transferido para um frasco com formol para realizar a confecção das laminas para estudo histopatológico (CARDOSO *et al*, 2007).

Após o procedimento cirúrgico os animais foram randomizados em três grupos experimentais (n=20), e receberam tratamentos diferenciados por 14 dias (MUKAI *et. al*, 2004). O primeiro grupo de animais (PL) recebeu como tratamento tópico diário 100 µL da formulação de gel. O segundo grupo, controle positivo (K), foi tratado diariamente com a aplicação tópica de 100 µL do fármaco collagenase. Os camundongos do terceiro grupo (controle negativo) não receberam tratamento (Grupo C).

3.9 Análise macroscópica das feridas

As avaliações macroscópicas das feridas nos dorsos dos animais foram realizadas diariamente, iniciando após 24 horas da cirurgia e até o 14º dia do período pós-operatório. As feridas foram fotografadas a uma distância constante, e a área de cada lesão calculada usando ImageJ[®] software. O percentual de contração da área das feridas foi expresso através da equação de Ramsey *et al.* (1995). % contração = $100 [(W_o - W_i)/W_o]$, onde W_o = área inicial da ferida e W_i = área final da ferida.

As feridas foram também analisadas quanto aos sinais flogísticos: hiperemia, edema, sangramento, secreção e crosta e classificadas de forma semiquantitativa, conforme sua intensidade, e de acordo com os escores: ausência (0); leve (1); moderado (2) e intenso (3).

3.10 Análises estatísticas

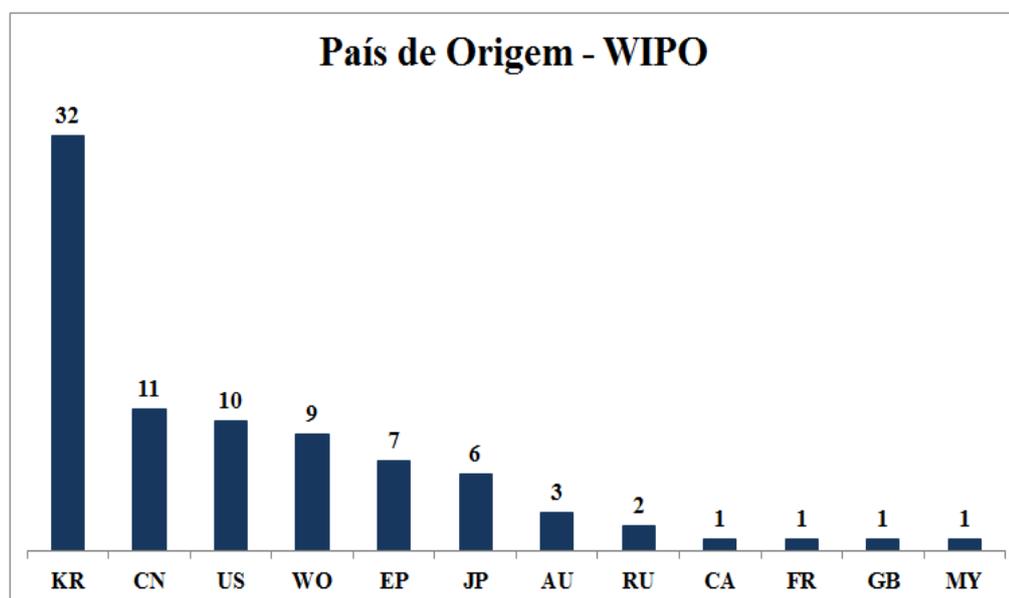
Os dados foram expressos como média \pm S.E.M e analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. Valores de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Prospecção de patentes por país de origem

No banco de dados do WIPO, foram encontrados 102 depósitos de patentes para o termo utilizado. Após a exclusão de patentes não relacionadas, os 82 documentos restantes foram utilizados para análises posteriores. Os depósitos foram classificados inicialmente quanto ao país de origem e os resultados estão expressos na Figura 3.1

Figura 32: Resultado do levantamento de patentes depositadas no WIPO classificadas em relação ao país de origem

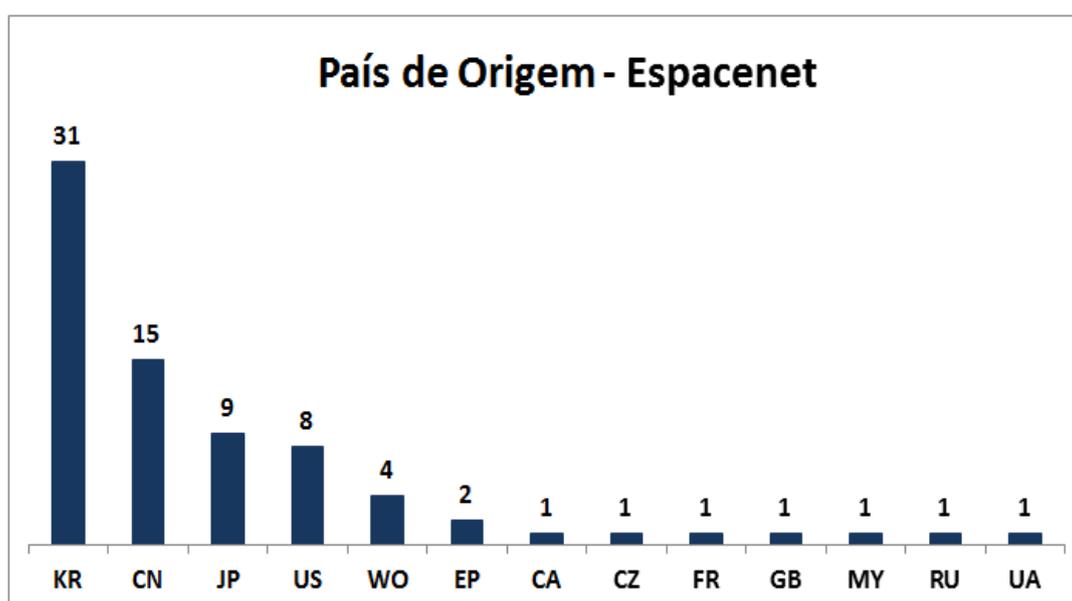


Fonte: Autoria própria (2018). KR = República da Coréia; CN = China; US = Estados Unidos da América; WO = Organização Mundial da Propriedade Intelectual; EP = Organização Europeia de Patentes; JP = Japão; AU = Austrália; RU = Federação Rússia; FR = França; MY = Malásia; CA = Canadá; GB = Reino Unido.

A República da Coréia encontra-se como o país com o maior número de depósitos, com 32 patentes. Esse resultado é aproximadamente três vezes maior que a quantidade de patentes depositadas pelo país com o segundo maior número de publicações, a China, com 11 patentes. Os Estados Unidos da América encontram-se em terceiro lugar (10 depósitos), seguido da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (9 depósitos), Instituto Europeu de Patentes (7 depósitos), Japão (6 depósitos), Austrália (3 depósitos) e a Federação Rússia (2 depósitos), dentre outros.

No banco de dados do Espacenet foi encontrado um número menor de patentes depositadas, com 95 depósitos. Após a exclusão dos documentos não relacionados, 76 patentes foram utilizadas para as classificações posteriores. O número de países depositantes nos dois bancos de dados é similar, com 12 países depositantes no WIPO e 13 países depositantes no Espacenet, com nove países em comum. Os resultados estão expressos na figura 3.2.

Figura 33: Resultado do levantamento de patentes depositadas no Espacenet classificadas em relação ao país de origem



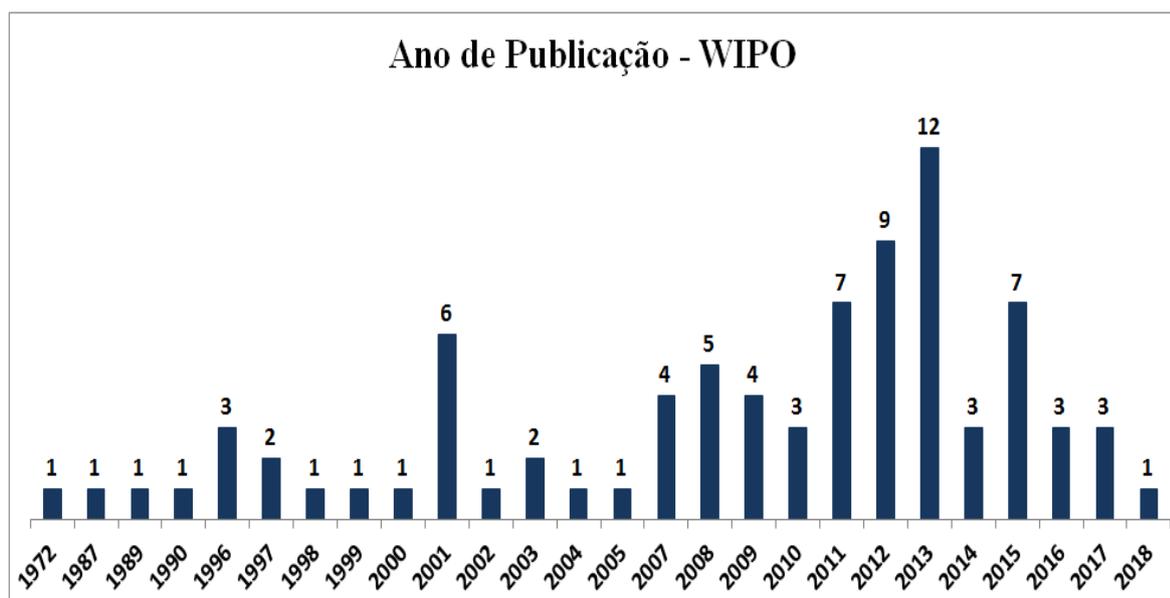
Fonte: Autoria própria (2018). KR = República da Coreia; CN = China; JP = Japão; US = Estados Unidos da América; WO = Organização Mundial da Propriedade Intelectual; EP = Organização Europeia de Patentes; CA = Canadá; FR = França; RU = Federação Rússia; UA = Ucrânia; MY = Malásia; CZ = República Tcheca; GB = Reino Unido.

Assim como no WIPO, foi encontrada uma predominância de depósitos para a República da Coreia (31 depósitos). O número de depósitos bastante similar ao do WIPO (32 depósitos) pode ser atribuído ao depósito da mesma patente nos dois bancos de dados por alguns autores. Em segundo lugar, novamente, está a China (15 depósitos), seguida do Japão (9 depósitos), Estados Unidos da América (8 depósitos), Organização Mundial da Propriedade Intelectual (4 depósitos) e a Organização Europeia de Patentes (2 depósitos), dentre outros.

3.4.2 Prospecção de patentes por ano de publicação

As patentes depositadas também foram classificadas em relação ao ano de publicação, com o resultado mais antigo nos dois bancos de dados no ano de 1972. No WIPO, houve uma constância de publicações a partir do ano de 1996, com uma média de publicações de 3,23 depósitos por ano. Essa média apresentou um aumento de 155,18% no período de 2008 a 2018 (5,18 publicações por ano). Esses resultados mostram que há um interesse constante em relação às publicações de patentes relacionadas a esses produtos, com um grande aumento nos anos recentes. Nesse período, o ano de 2013 possuiu o maior número de publicações (12 depósitos) e somente uma patente está depositada no ano de 2018. Isso pode ser atribuído ao fato da pesquisa para a confecção deste artigo ter sido realizada no primeiro semestre do ano de 2018. Os resultados estão expressos na figura 3.3.

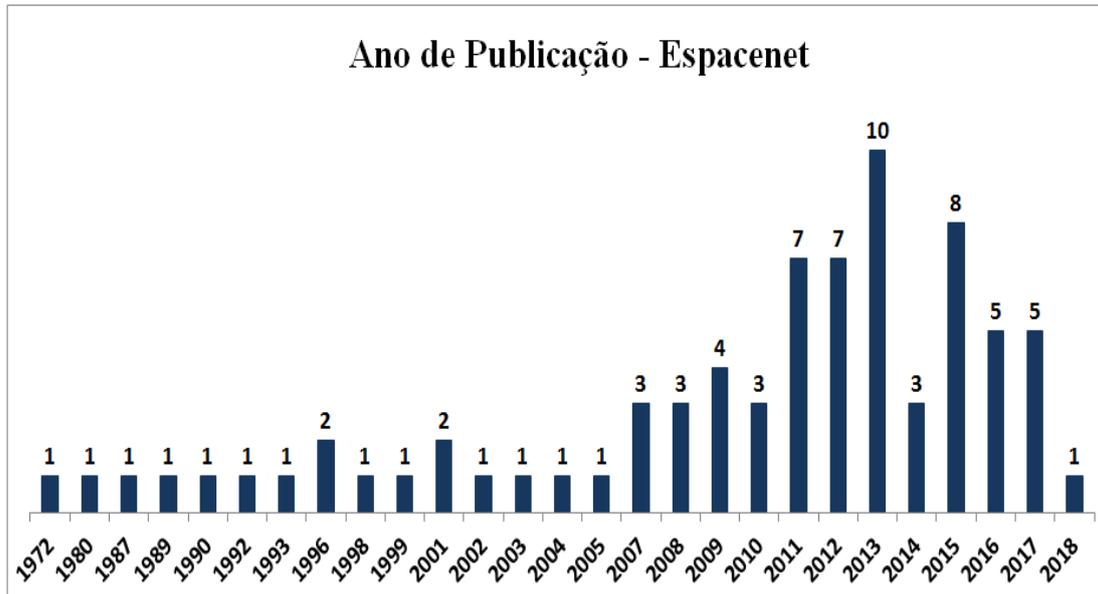
Figura 34: Resultado do levantamento de patentes depositadas na WIPO classificadas pelo ano de publicação



Fonte: Autoria própria (2018)

No Espacenet, a publicação de patentes foi constante entre os anos de 1998 a 2005 e de 2007 a 2018. A média de publicações foi de 2,81 depósitos por ano e esse valor aumentou bastante no período de 2008 a 2018, correspondendo a um aumento de 181,13%. Esse resultado está de acordo com o encontrado para a WIPO, indicando um grande aumento no interesse do desenvolvimento de produtos a base de hidrogéis de ágar. Novamente, o ano de 2013 destaca-se como o ano com o maior número de publicações (10 depósitos). Os resultados estão expressos na figura 3.4.

Figura 35: Resultado do levantamento de patentes depositadas na Espacenet classificadas pelo ano de publicação

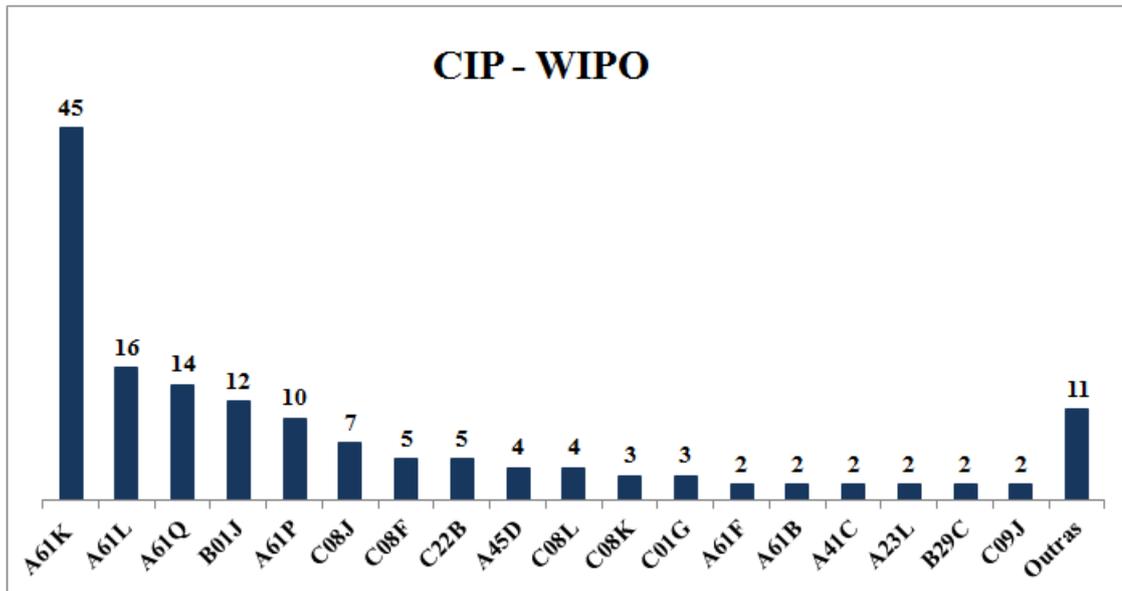


Fonte: Autoria própria (2018)

4.3 Classificação Internacional de Patentes (CIP)

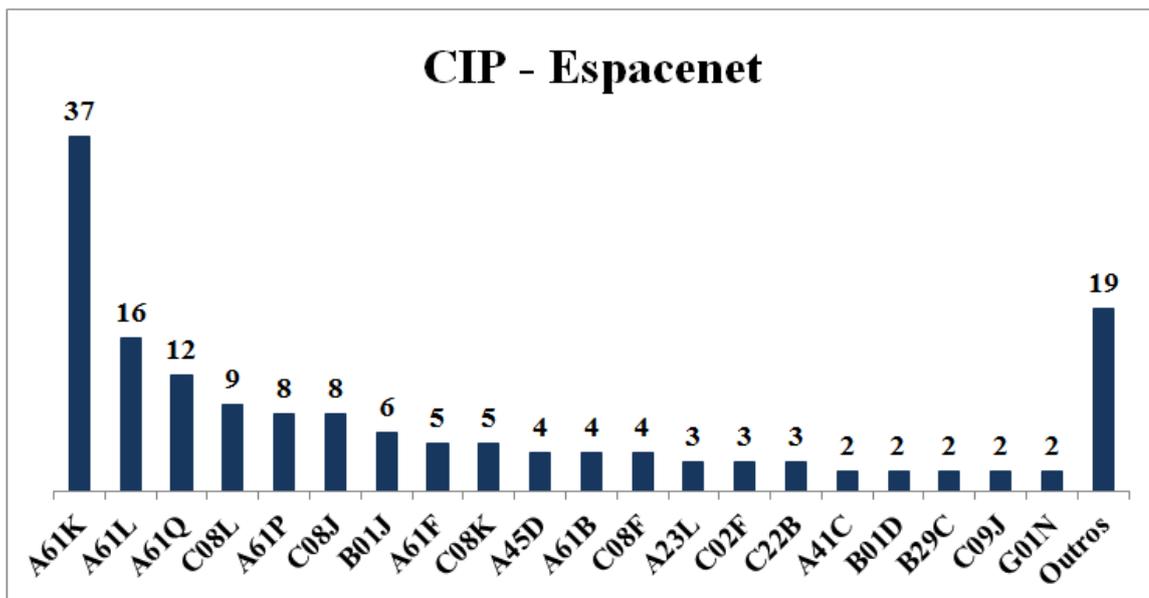
A Classificação Internacional de Patentes (CIP) permite a classificação de patentes em seções (de A a H), subseções, classes, subclasses e grupos, de acordo com a sua área de aplicação. As pesquisas nos bancos de dados foram realizadas em relação às subclasses dos documentos e o número de CIPs encontradas foi superior ao número de depósitos, pois cada patente pode se enquadrar em mais de uma subclasse. Os resultados estão expressos nas figuras 3.5 e 3.6.

Figura 36: Patentes depositadas no WIPO classificadas pela Classificação Internacional de Patentes (CIP)



Fonte: Autoria própria (2018)

Figura 37: Patentes depositadas no Espacenet classificadas pela Classificação Internacional de Patentes (CIP)



Fonte: Autoria própria (2018)

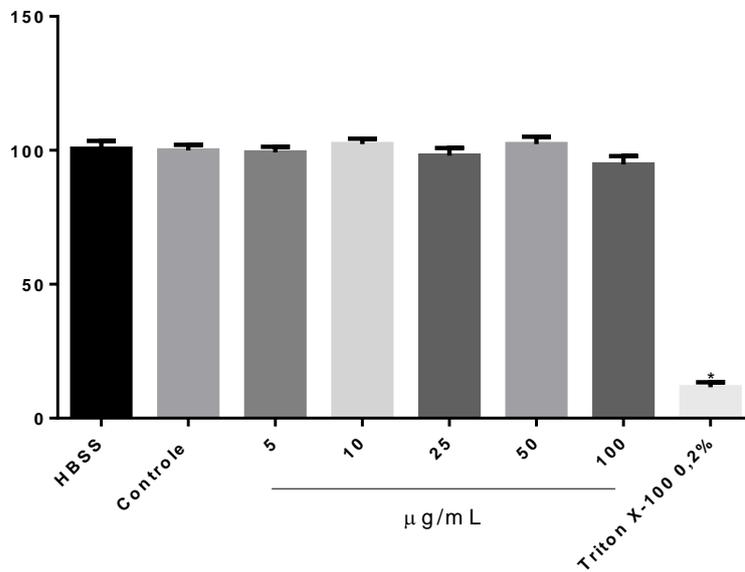
No banco de dados do WIPO e do Espacenet, foi encontrado um maior número de resultados para a seção A (necessidades humanas), com a subclasse A61K apresentando o maior número de depósitos (45 depósitos no WIPO e 37 no Espacenet). Essa seção corresponde a preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas. Esse resultado pode ser atribuído ao grande número de patentes de produtos com aplicações biomédicas.

A subclasse com o segundo maior número de resultados é a A61L (16 depósitos no WIPO e no Espacenet) e esta se refere a métodos ou aparelhos para esterilizar materiais ou objetos em geral; desinfecção, esterilização ou desodorização do ar; aspectos químicos de ataduras, curativos, almofadas absorventes ou artigos cirúrgicos; materiais para ataduras, curativos, almofadas absorventes ou artigos cirúrgicos. Essa classificação foi utilizada para documentos que correspondiam a produtos utilizados como curativos.

Em seguida, está a subclasse A61Q (14 depósitos no WIPO e 12 no Espacenet), que corresponde ao uso específico de cosméticos ou preparações similares para higiene pessoal. Esses resultados estão de acordo com o observado, pois muitos dos produtos a base de hidrogéis de ágar encontrados são utilizados como curativos ou para aplicações dermatológicas.

3.4.4 Teste do MTT

A adição de *G. intermedia* nas concentrações estudadas (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) não foi capaz de alterar significativamente a viabilidade celular quando comparada ao grupo controle (100% de células viáveis) (Figura 3.7). Por sua vez o Triton X-100 0,2% v/v (padrão citotóxico) apresentou redução da viabilidade celular de 80% quando comparado ao grupo controle, o que validou o método em estudo. O fato de PGI não apresentar citotoxicidade no teste do MTT nestas concentrações torna-o uma molécula promissora para ser utilizada em diversas aplicações industriais que envolvam o uso humano.

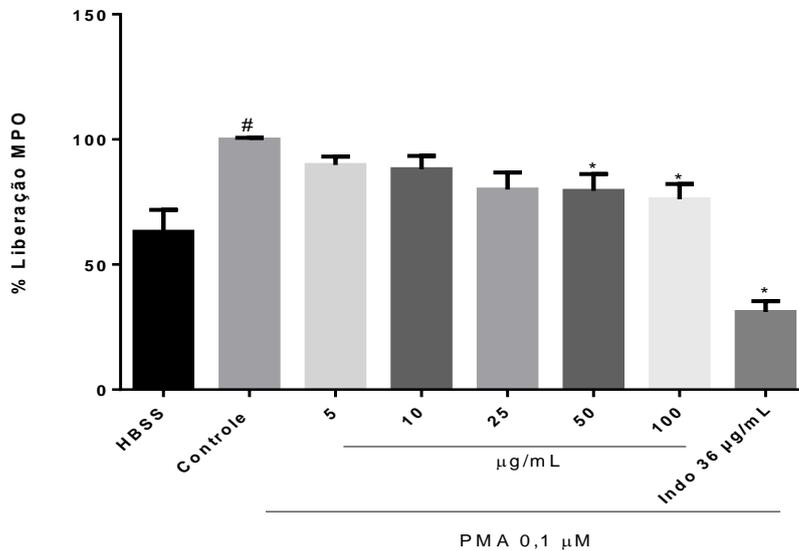
Figura 38: Citotoxicidade de PGI em diferentes concentrações

Os resultados estão expressos como % de células viáveis * vs HBSS ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

3.4.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A adição de PMA ($0,1 \mu\text{M}$) ao grupo controle foi capaz de aumentar a liberação de mieloperoxidase quando comparada ao grupo não tratado (HBSS), essa estimulação foi significativamente inibida quando as células foram tratadas com *G. intermedia* nas maiores concentrações estudadas 50 e $100 \mu\text{g/mL}$, em um percentual aproximado de 21% e 24% respectivamente. A indometacina, droga anti-inflamatória padrão, utilizada no estudo também foi capaz de inibir significativamente a liberação de mieloperoxidase, em um percentual de 69% (Figura 3.8). O fato de PGI ser capaz de atuar no processo inflamatório torna-o uma molécula promissora para ser utilizada em outros processo que envolvam inflamação, como cicatrização.

Figura 39: Atividade anti-inflamatória de PGI em diferentes concentrações

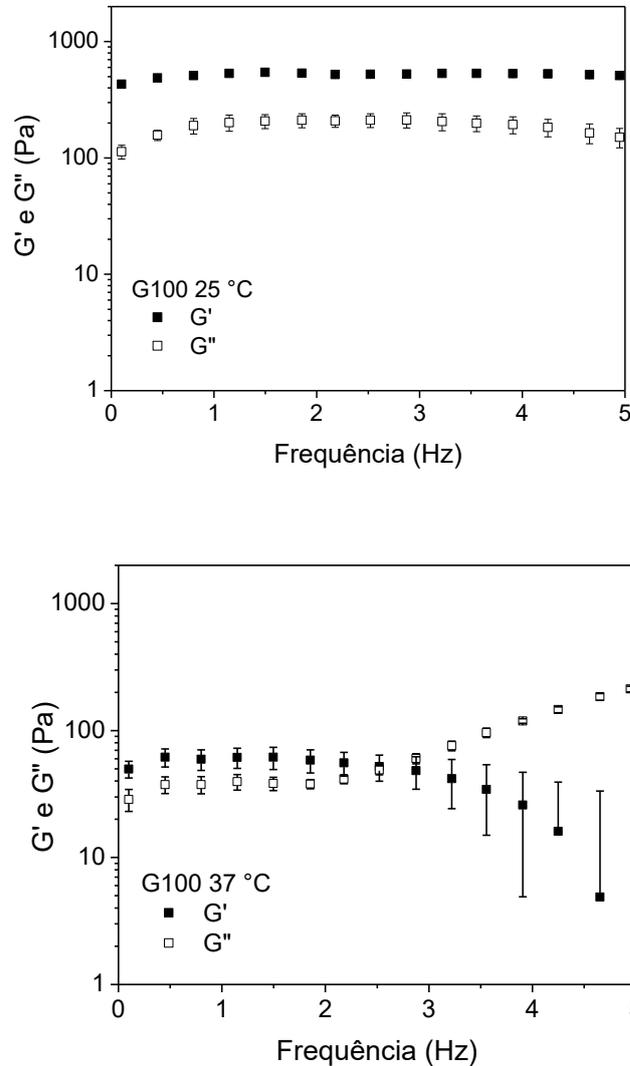


Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. # vs HBSS; * vs Controle + vs INDO ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

3.4.6 Módulo G' e G'' do gel

O gel formado por PGI + galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* apresentou propriedades elásticas ($G' > G''$) (Figura 3.9). A razão G'/G'' demonstra a força do gel, e quanto maior a razão mais forte a força do gel formado (LAPASIN, 2012). Com base na razão G'/G'' , PGI e agalactomanan de *Caesalpinia pulcherrima* formaam o gel nas concentrações utilizadas (p/v ; em água destilada) formado na frequência de 1,1 Hz. Um fator interessante para o uso do gel como aplicação tópica foi o fato deste se manter na forma de gel a 25 °C mesmo com o aumento da frequência, enquanto que na temperatura próxima à do corpo humano (37°C), o aumento da frequência faz com que o gel perca sua característica elástica aos poucos vá se transformando em um fluido. Esta característica é interessante pois em uma possível aplicação tópica, este gel espalharia mais rapidamente sobre a superfície da ferida. De acordo com estudos estruturais de agaranas, os agregados de hélice formam uma estrutura microcristalina mais estável que nas carragenanas (WATASE; NISHINARI, 1981)

Figura 40 - Efeito do gel nos módulos de armazenamento e dissipação medidos pelo teste de varredura de frequência a 25°C e 37°C.



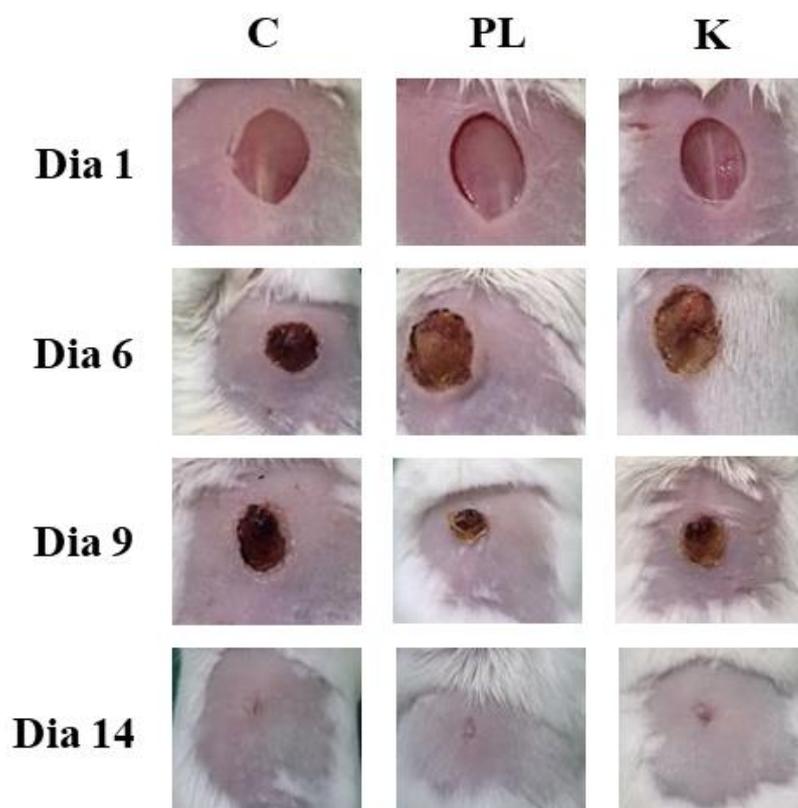
O módulo de armazenamento (G') foi maior que o módulo de dissipação (G'') em toda a faixa de frequência coberta e em ambos os módulos foram quase independentes da frequência nas concentrações que formaram géis. Os géis são caracterizados como fortes e fracos com base na relação G'/G'' . Quando a junção intermolecular tem alta energia de ligação, a razão G'/G'' encontra-se maior que 3, formando um verdadeiro gel com comportamento reológico de “gel-forte” (LAPASIN, 2012; BAO *et al.*, 2016).

A estrutura das agaranas é fortemente influenciada pela presença de grupos carregados que participam das ligações intermoleculares de pontes de hidrogênio (MURANO, 1995; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 1997), e a força do hidrocolóide é irreversivelmente proporcional aos grupos sulfatados presente em sua estrutura (COSSON *et al.*, 1995). Além disso, a literatura relata que o conteúdo de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose na estrutura

química dos agares de espécies de *Gracilaria* e *Gelidium* é um componente importante para o estabelecimento da força e textura dos géis (LAHAYE; ROCHAS, 1991; WHYTE; ENGLAR, 1981). Outro fator importante observado é que o forte comportamento de gel pode estar associado ao seu alto peso molecular e ao tamanho desse polímero; essas características refletem uma alta capacidade de formar uma reticulação tridimensional entre a água e as hélices do gel (BIRD; HANISAK; RYTHER, 1981; SOUZA *et al.*, 2012).

3.4.5 Avaliação macroscópica das feridas

Durante os 14 dias do experimento a evolução das áreas das lesões foi avaliada macroscopicamente (Figuras 3.10 e 3.11) indicando uma reepitelização efetiva através do tratamento com a formulação cicatrizante em comparação ao controle negativo. Em relação à área da ferida, no terceiro dia de tratamento houve um leve aumento ($p < 0,05$) na área da ferida no grupo tratado com a formulação cicatrizante e no grupo não tratado. Este aumento da área da ferida nos primeiros dias em experimentos cicatrizantes em camundongos é geralmente causado pelos movimentos dos animais, gerados pelo desconforto proveniente da ferida. Entretanto, o grupo tratado com Kollagenase não apresentou este aumento, demonstrando que a formulação não foi efetiva para a cicatrização nos primeiros dias de tratamento. O grupo tratado com PGi + galactomanana apresentou uma discreta hiperemia, e edema moderado, e os animais tratados com salina, demonstraram edema, moderada hiperemia e presença de exsudato. Os primeiros dias do processo de cicatrização se caracterizam pela resposta inflamatória do organismo (DEODHAR, 1997), apesar de PGi ter apresentado atividade anti-inflamatória anteriormente, ele não foi capaz de melhorar a cicatrização nesta fase do processo.

Figura 41: Evolução das feridas após tratamento em lesões induzidas em camundongos**Tabela 3.2** Efeito dos tratamentos na evolução das áreas das lesões induzidas em camundongos

Grupo	Área da ferida em relação dia 1		
	Dia 3	Dia 7	Dia 14
C	136,8%	60,2%	0,05%
PL	112%	46,9%	0,04%
K	90,1%	52,2%	0,04%

Fonte: Elaborado pelo autor

No sétimo dia, todos os grupos apresentaram diminuição da área das lesões, porém no grupo em que foi administrada o gel cicatrizante observou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) nas áreas das feridas quando comparado com o controle nos dias 3 e 7, inclusive com uma área de ferida menor do que a apresentada pelo grupo tratado com Kollagenase. O grupo tratado com PGI + galactomanana não apresentou hiperemia ou edema, por outro lado, os animais tratados com salina, demonstraram hiperemia moderada. Entre o terceiro e sétimo dia da cicatrização, se inicia a fase da proliferação de fibrblastos, na qual estas células começam a se depositar sobre a ferida com a finalidade de fecha-la. O polissacarídeo presente no gel pode estar atuando nessa fase da cicatrização como um *scaffold*, servindo como molde ou esqueleto para a deposição destas células e facilitando assim a sua proliferação (SOUSA, 2019). No décimo quarto dia, a maioria dos animais de todos os grupos tratados apresentaram fechamento quase completo da ferida, tempo dentro da média nas fases cicatrização de ferimentos cutâneos (DEODHAR, 1997).

3.5 Conclusão

O mapeamento de patentes para produtos a base de hidrogéis de ágar, utilizando o termo “*Agar*” and “*Hydrogel*”, mostra que entre 2008 e 2018, houve um aumento no número de documentos depositados, o que pode ser atribuído a um aumento no interesse do desenvolvimento de produtos com essa composição. PGI apresentou baixa atividade citotóxica e efeito anti-inflamatório *in vitro*. O gel formado por PGI e galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* manteve-se na forma de gel a temperatura ambiente e à temperatura corpórea apresentou a capacidade de perder sua característica elástica com o aumento da frequência. Além disso, no teste cicatrizante, o gel apresentou a capacidade de acelerar a cicatrização no período entre três e sete dias de tratamento.

REFERÊNCIAS

- AFSHARI, A; SAYYED-ALANGI, S. Z. Antioxidant effect of leaf extracts from *Cressa cretica* against oxidation process in soybean oil. **Food science & nutrition**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 324-333, 2017.
- AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications. **Journal of advanced research**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 105-121, 2013.
- ALBALASMEH, A.A.; BERHE, A.A; GHEZZEHEI, T.A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.
- ALENCAR, P. O. C.; *et al.* A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: in vitro and in vivo activities. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 90, p. 28-34, 2019.
- ALMEIDA, H. W. B. **Extração, caracterização estrutural parcial e atividades farmacológicas do alginato obtido da alga marrom *Lobophora variegata* (LAMOUIROX) Oliveira Filho**. 2014. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.
- AMINABHAVI, T. M. Polysaccharide-based hydrogels as biomaterials in drug delivery. **Journal of Pharmacological and Care Health**, [s. l.], v. 2, p. 132, 2015.
- AMORIM, R. N. S. *et al.* Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 171-181, 2012.
- ANAND, J. *et al.* Bioactive potential and composition analysis of sulfated polysaccharide from *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgeson. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 111, p. 1238-1244, 2018.
- ANDRIAMANANTOANINA, H.; CHAMBAT, G; RINAUDO, M. Fractionation of extracted madagascan *Gracilaria corticata* polysaccharides: structure and properties. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 77-88, 2007.
- ANDRADE, L. R. *et al.* Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine pollution bulletin**, [s. l.], v. 60, n. 9, p. 1482-1488, 2010.
- ANDRADE, R.M. *et al.* In vitro inhibition of thrombin generation by sulfated polysaccharides from the marine alga *Solieria filiformis* (Kützing) Gabrielson (Solieriaceae, Rhodophyta)/Inibição in vitro de geração de trombina por polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Solieria filiformis* (Kützing) Gabrielson (Solieriaceae; Rhodophyta). **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 1-10, 2017.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis**

Research, [s. l.], v. 114, p. 447-453, 2004.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of applied phycology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 231, 1995.

ARMISEN, R.; GAIATAS, F. Agar. **Handbook of hydrocolloids**. [s. l.], Woodhead Publishing, 2009. p. 82-107.

ARMISEN, R.; GAIATAS, F. Production, properties and uses of agar. **Production and utilization of products from commercial seaweeds**, [s. l.], v. 288, p. 1-57, 1987.

AUST, O.; SIES, H.; STAHL, W.; POLIDORI, M.C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. **Journal of Chromatography**, [s. l.], v. 936, n. 1, p. 83-93, 2001.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2. ed. São Paulo: Manole, 1991.

BAO, H. *et al.* Chemical and rheological properties of polysaccharides from fruit body of *Auricularia auricular-judae*. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 57, p. 30-37, 2016.

BARBA, FRANCISCO J. Microalgae and seaweeds for food applications: Challenges and perspectives. **Food research international**, Ottawa - Ontario, v. 99, n. Pt 3, p. 969, 2017.

BARBER, D. A.; HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. **American pharmacy**, [s. l.], n.9, p. 26-35, 1994.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. [s. l.], Elsevier, 1989.

BARROS, F.C.N. *et al.* Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 598-603, 2013.

BENEVIDES, N. M. B.; SILVA, L. M. C. M. ; HOLANDA, M. L. . Desenvolvimento de um gel à base de algas marinhas para o tratamento de diversos tipos diferentes de lesões o tratamento de lesões cutâneas s. 2010, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR013100000432, data de depósito: 20/08/2010, título: "Desenvolvimento de um gel à base de algas marinhas para o tratamento de lesões cutâneas s" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Bernardi, G.; Springer, G.F. Properties of highly purified fucan. **Journal of Biological Chemistry** [s. l.], v. 237, p. 75–80, 1962

BERTONI, F.A. *et al.* Application of green seaweed biomass for MoVI sorption from contaminated waters. Kinetic, thermodynamic and continuous sorption studies. **Journal of colloid and interface science**, [s. l.], v. 446, p. 122-132, 2015.

BEZERRA, F. *et al.* Antidiarrheal activity of a novel sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cervicornis*. **Journal of ethnopharmacology**, [s. l.], v. 224, p. 27-35,

2018.

BHATIA, S. *et al.* In vitro antioxidant and antinociceptive properties of *Porphyra vietnamensis*. **BioMedicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.

BHATTACHARYYA, SUMIT *et al.* carrageenan-induced innate immune response is modified by enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds. **The Journal of nutritional biochemistry**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 906-913, 2010.

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. Algal phylogeny and the origin of land plants. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 116, n. 1, p. 9-15, 1998.

BIRD, K.T.; HANISAK, M. D.; RYTHER, J. Chemical quality and production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different nitrogen enrichment conditions. **Botanica marina**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 441-444, 1981

BIRD, C. J.; HELLEUR, R. J.; HAYES, E. R.; MCLACHLAN, J. Analytical pyrolysis as a taxonomic tool in *Gracilaria* (Rhodophyta: Gigartinales). **International Seaweed Symposium**, [s. l.], v. 12, p. 207-212, 1987.

BITHELL, T. C. Blood coagulation. In LEE, G. R.; BITHEL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. v. 1. Philadelphia, 1993.

BOATENG, J. S. *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BOLTON, L.; VAN RIJSWIJK, L. Wound dressings: meeting clinical and biological needs. **Dermatology nursing/Dermatology Nurses' Association**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 146-161, 1991.

BOURIN, M. C.; LINDAHL, U. Glicosaminoglycans and the relation of blood coagulation. **Biochemistry Journal**, London, v. 289, n.1, p. 313-330, 1993.

BOZZINI, C.E. & MOLINAS, F. Hemostasia. In: HOUSSAY, A.B., CIRGOLANI, H.E. **Fisiologia Humana de Houssay**, 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, D.G.; MIN, D.B. Singlet oxygen oxidation of foods. [s. l.], **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 211-236, 1992.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BURG, A.; OSHRAT, L. Salt effect on the antioxidant activity of red microalgal sulfated polysaccharides in soy-bean formula. **Marine drugs**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 6425-6439, 2015.

BUTTERFIELD, D. A. *et al.* Nutritional approaches to combat oxidative stress in

Alzheimer's disease. **The journal of nutritional biochemistry**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 444-461, 2002.

CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 65, p. 252-267, 2015.

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

CARDOSO, J. F. *et al.* Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. **Toxicologic pathology**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 890-896, 2007

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, [s. l.], v. 51, p. 15-25, 2013.

CASTRO, J.P.L. *et al.* Polysaccharides of red alga *Gracilaria intermedia*: structure, antioxidant activity and rheological behavior. **Polímeros**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 178-186, 2018.

CASCONE, M. G. *et al.* Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 267-281, 2001.

CERQUEIRA, M. A. *et al.* Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 408-414, 2009.

CHEN, X. *et al.* Partial characterization, the immune modulation and anticancer activities of sulfated polysaccharides from filamentous microalgae *Tribonema* sp. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 322, 2019.

CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLLIEC-JOUAULT, S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohydrate Residue**. [s. l.], v. 330, p. 529–535, 2001

CHOE, E.; MIN, D.B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 345-358, 2009.

CHUN-HUI, L. *et al.* Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of *Aloe barbadensis* irrigated with sea water. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 961-970, 2007.

CHUNG, S.S.M. *et al.* Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. **Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 233-236, 2003.

CLARKE, KATHY W.; TRIM, CYNTHIA M. **Veterinary anaesthesia**. [s. l.], Elsevier Health Sciences, 2013.

CLAYSON, D.B. *et al.* The significance of induced forestomach tumors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 441-463, 1990.

COHEN, M. The role of low-molecular-weight heparins in arterial diseases: optimizing antithrombotic therapy. **Thrombotic Resume**, New York, v. 100, v131-v139, 2000.

CORTHELL, J.T. **Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls**. Academic Press, 2014.

COSSON, J. *et al.* Carrageenans and agars, red algal polysaccharides. **Progress in phycolological research**, [*s. l.*], v. 11, p. 269-324, 1995.

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

COSTA, L. S. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. **Marine drugs**, [*s. l.*], v. 9, n. 6, p. 952-66, 2011.

COURA, C.O. *et al.* Mechanisms involved in antinociception induced by a polysulfated fraction from seaweed *Gracilaria cornea* in the temporomandibular joint of rats. **International journal of biological macromolecules**, [*s. l.*], v. 97, p. 76-84, 2017.

CRAIGIE, J. S. Biology of the red algae. **Cell Walls**, p. 221-257, 1990.

CROCE, M.E.; VILLAR, M.A.; PARODI, E.R. Assessment of alternative sources of seaweed polysaccharides in Argentina: potentials of the agarophyte *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Gaillon (Rhodophyta, Gelidiales). **Journal of applied phycology**, [*s. l.*], v. 27, n. 5, p. 2099-2110, 2015.

CUMASHI A; USHAKOVA N.A; PREOBRAZHENSCKAYA M.E; D'INCECCO A; PICCOLI A; TOTANI L. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, [*s. l.*], v. 17, p. 541-552. 2007.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **Lancet**, Boston, v. 355, p. 1627-1632, 2000.

DEODHAR, A. K. *et al.* Surgical physiology of wound healing: a review. **Journal of Postgraduate Medicine**, [*s. l.*], v. 43, n. 2, p. 52, 1997.

DI, T. *et al.* Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. **Journal of Functional Foods**, [*s. l.*], v. 28, p. 64-75, 2017.

DRABIK, A.; BODZOŃ-KUŁAKOWSKA, A.; SILBERRING, J. Gel electrophoresis. In: **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry**. Elsevier, 2016. p. 115-143.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar: part I fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydrate Research**, [*s. l.*], v. 16, n. 1, p. 189-197, 1971.

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

FARVIN, K.H.S. *et al.* Chemical profile and antioxidant activities of 26 selected species of seaweeds from Kuwait coast. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], p. 1-16, 2019.

FERNÁNDEZ-BARBERO, A. *et al.* Gels and microgels for nanotechnological applications. **Advances in colloid and interface science**, [s. l.], v. 147, p. 88-108. 2009.

FERNANDO, I.P.S. *et al.* Algal polysaccharides: potential bioactive substances for cosmeceutical applications. **Critical reviews in biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 99-113, 2019

FLEITA, D.; EL-SAYED, M.; RIFAAT, D. Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. **LWT-Food Science and Technology**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 1236-1244, 2015.

FREHNER, E.; WATTS, R. Evidence summary: Wound management-hydrogel dressings without additional therapeutic additives. **Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 59, 2016.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatan, Mexico. **Journal of applied Phycology**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 533, 1997.

FURIE, B.; FURIE B. C. Molecular basis of blood coagulation. **In: HOFFMAM, R.; BENZ, E. J. SHATTIL, S. J., FURIE. B. COHEN, H. J., SIBERSHIN L. J. MCGLOVE, P. (Eds) Hematology, Basic Principles and Practice**, 3 ed., Philadelphia:Churchill Livingstone, p. 1783-1804, 2000.

GARCIA-VAQUERO, M.; HAYES, M. Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development. **Food Reviews International**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 15-45, 2016.

GENTRY, P. A.; Comparative aspects of blood coagulation. **Veterinary Journal.**, London, v. 198, p.238-251, 2004.

GHADIRYANFAR, M. *et al.* A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 54, p. 473-481, 2016.

GIBOREAU, A.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B. Rheological behaviour of three biopolymer/water systems, with emphasis on yield stress and viscoelastic properties. **Journal of Texture Studies**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 119-138, 1994.

GOMES, J.A.C.B. *et al.* In Vivo Evaluation of the antioxidant activity and protective action of the seaweed *Gracilaria birdiae*. **Oxidative medicine and cellular longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018.

GRANT, C.A. *et al.* Mechanical investigations on agar gels using atomic force microscopy: effect of deuteration. **Macromolecular Materials and Engineering**, [s. l.], v. 297, n. 3, p. 214-218, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; **Fundamentos de fisiologia médica**. Elsevier Brasil, 2011.

HALLIWELL, B. Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free radical research**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 57-74, 1996.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 7, p. 715S-725S, 1993.

HARDING, K.; CUTTING, K.; PRICE, P. The cost-effectiveness of wound management protocols of care. **British Journal of Nursing**, [s. l.], v. 9, n. Sup3, p. S6-S24, 2000.

HE, X. *et al.* The composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from the red alga *Chondrus verrucosus*. **Fisheries Science**, [s. l.], v. 85, n. 5, p. 859-865, 2019.

HENTATI, F. *et al.* Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 198, p. 589-600, 2018.

HOEK, C. *et al.* **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge: University Press, 1995.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 18-23, 2012.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematology/oncology clinics of North America**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1-11, 2007.

HOLTKAMP, A. D. *et al.* Fucoidans and fucoidanases—focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 1, 2009.

IZUMI, K. Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, [s. l.], v. 320, n. 2, p. 311-317, 1973.

JABALLI, I. *et al.* Polysaccharide from a Tunisian red seaweed *Chondrus canaliculatus*: structural characteristics, antioxidant activity and in vivo hemato-nephroprotective properties on maneb induced toxicity. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 123, p. 1267-1277, 2019.

JIAO, G. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine drugs**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; RUPÉREZ, P. Infrared characterisation, monosaccharide profile and antioxidant activity of chemical fractionated polysaccharides from the edible seaweed sugar Kombu (*Saccharina latissima*). **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 45, p. 220-229, 2014.

- JIN, N. Z.; GOPINATH, S.C.B. Potential blood clotting factors and anticoagulants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 84, p. 356-365, 2016.
- JIN, S. G. *et al.* Influence of hydrophilic polymers on functional properties and wound healing efficacy of hydrocolloid based wound dressings. **International journal of pharmaceutics**, [s. l.], v. 501, n. 1, p. 160-166, 2016.
- KISKER, C.; SCHINDELIN, H.; REES, D.C. Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. **Annual review of biochemistry**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 233-267, 1997.
- KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanography Marine Biological Annual Review**, [s. l.], v.26, p.259-315, 1988
- KRASNER, D. *et al.* The ABCs of wound care dressings. **Ostomy/wound management**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 66, 68-9, 72 passim, 1993.
- LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of applied Phycology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 173-184, 2001.
- LAHAYE, M. *et al.* ¹³C-NMR spectroscopic investigation of methylated and charged agarose oligosaccharides and polysaccharides. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 190, n. 2, p. 249-265, 1989.
- LAINÉ, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic “gastritis”: a prospective evaluation. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 1254-1262, 2009.
- LAJILI, S. *et al.* Characterization of sulfated polysaccharide from *Laurencia obtusa* and its apoptotic, gastroprotective and antioxidant activities. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 126, p. 326-336, 2019.
- LEADLEY J.R. *et al.* Contribution of *in vivo* models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. [s. l.], v. 43, p. 101-116. 2000.
- LEE, H. *et al.* Toxicity testing of cosmetic ingredients using gametophyte beads of the brown alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). **Journal of Applied Phycology**, p. 1-13, 2019.
- LEE, W.K. *et al.* Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 164, p. 23-30, 2017.
- LEÓDIDO, A.C.M. *et al.* Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 97, p. 34-45, 2017.
- LI, B. *et al.* Fucoidan: structure and bioactivity. **Molecules**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1671-1695, 2008.

LIU, B. *et al.* The anti-diarrhea activity of red algae-originated sulphated polysaccharides on ETEC-K88 infected mice. **RSC Advances**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 2360-2370, 2019.

LI, N. *et al.* Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 159, p. 195-206, 2017

LIMA, E. S; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v.37, n.3, p. 293-303, 2001.

LIMA, A. O.; SOARES, J. B.; GRECO, J. B.; GALIZZI, J.; CANÇADO, J. R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorfonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **The Journal of Immunology**. [s. l.], v. 132, p. 2015-2020, 1984

MACIEL, J.S. *et al.* Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 559-565, 2008.

MAESSEN-VISCH, M. B.; MONTFRANS, V. C. Wound dressings, does it matter and why?. **Phlebology**, [s. l.], v. 31, n. 1 su p. 63-67, 2016.

MALKIN, A.Y; ISAYEV, A.I. **Rheology: concepts, methods, and applications**. Elsevier, 2017

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.],v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

MANHIVI, V.E. *et al.* Composition, thermal and rheological properties of polysaccharides from amadumbe (*Colocasia esculenta*) and cactus (*Opuntia spp.*). **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 195, p. 163-169, 2018

MARINHO, G.S. *et al.* Antioxidant content and activity of the seaweed *Saccharina latissima*: a seasonal perspective. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.],v. 31, n. 2, p. 1343-1354, 2019.

MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). **Journal of biotechnology**, [s. l.],v. 89, n. 1, p. 81-84, 2001.

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

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Bioresource technology**, [s. l.],v. 96, n. 3, p. 379-382, 2005.

MARQUES, F.C.J. *et al.* Galactomannan from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* prevents indomethacin-induced gastrointestinal damage via neutrophil migration. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 141, p. 68-75, 2019.

MAYER, A., *et al.* Marine pharmacology in 2012–2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine drugs**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 273, 2017

MAZUMDER, S. *et al.* Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 31, n. 1-3, p. 87-95, 2002.

MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E. Interfacial antioxidants: A review of natural and synthetic emulsifiers and coemulsifiers that can inhibit lipid oxidation. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 20-35, 2017.

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

Medmarket Diligence - **Worldwide Wound Management, Forecast to 2024: Established and Emerging Products, Technologies and Markets in the Americas, Europe, Asia/Pacific and Rest of World Disponível em:** <http://mediligence.com/rpt/rpts251.htm?_ga=1.199262184.751460919.1465048427> **Accesso em: 01 jun. 2016.**

MEENA, R. *et al.* Superior quality agar from *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) collected from the gulf of Mannar, India. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 397, 2008.

MEHTA, G. K. *et al.* Preparation of galactans from *Gracilaria debilis* and *Gracilaria salicornia* (Gracilariales, Rhodophyta) of Indian waters. **Journal of applied phycology**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 623-627, 2010.

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

MENDES M. M. *et al.* anti-thrombin, anti-adhesive, anti-migratory, and anti-proliferative Activities of sulfated galactans from the tropical green seaweed, *Udotea flabellum*. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 5, 2019.

MENDONÇA, R. J. D.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização . **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 257–262, 2009.

MICHEL, G. *et al.* Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 71, n. 1, p. 23-33, 2006.

MENSHOVA, R. V. *et al.* Fucoidans extracted from the brown alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 3, p. 129, 2016.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001

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

MILLER, I. J.; FURNEAUX, R. H. The structural determination of the agaroid polysaccharides from four new zealand algae in the order ceramiales by means of ¹³CNMR spectroscopy. **Botanica marina**, v. 40, n. 1-6, p. 333-340, 1997.

MINGHOU, J.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Structure of agar from *Gracilaria* spp (Rhodophyta) collected in the people's republic of China. **Botanica marina**, v. 28, n. 12, p. 521-528, 1985.

MORRIS, E.R. Molecular interactions in polysaccharide gelation. **British Polymer Journal**, v. 18, n. 1, p. 14-21, 1986

MOORE, K. *et al.* Prediction and monitoring the therapeutic response of chronic dermal wounds. **International wound journal**, v. 3, n. 2, p. 89-98, 2006.

MORGADO, P. I.; AGUIAR-RICARDO, A.; CORREIA, I. J. Asymmetric membranes as ideal wound dressings: an overview on production methods, structure, properties and performance relationship. **Journal of Membrane Science**, [s. l.], v. 490, p. 139–151. 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 65, p. 55- 63, 1983.

MOURA N.E. de *et al.* Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 1953-1960, 2011.

MUKAI, K. *et al.* Evaluation of the effects of a combination of Japanese honey and hydrocolloid dressing on cutaneous wound healing in male mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 205, 2015.

MUNIZAGA, G. T; CÁNOVAS, G.V.B. Rheology for the food industry. **Journal of food engineering**, [s. l.], v. 67, n. 1-2, p. 147-156, 2005

MURANO, E. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 245, 1995.

MURANO, E. *et al.* Chemical and macromolecular characterisation of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 171-178, 1992.

MURRAY, F. J. *et al.* Developmental toxicity study of sodium molybdate dihydrate administered in the diet to sprague dawley rats. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 49, p.

202-208, 2014.

NAÉ, H. N. Introduction to rheology. **Cosmetic science and technology series**, [s. l.], v. 3, p. 9-9, 1993.

NAGUMO, Terukazu; NISHINO, Takashi. Fucan sulfates and their anticoagulant activities. In: **Polysaccharides in medicinal applications**. Routledge, 2017. p. 545-574.

NAMVAR, F. *et al.* Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*Sargassum muticum*). **BioMed research international**, [s. l.], v. 201, 2013.

NARDELLA, A. *et al.* Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 289, p. 201-208, 1996.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 7 ed., Porto Alegre: Artmed, 2018.

NETO, E. M. *et al.* Chemically sulfated galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* seed: Characterization and toxicity evaluation. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 101, p. 1013-1017, 2014.

NGO, D. H.; KIM, S. K. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 62, p. 70-75, 2013.

NIL, S. *et al.* Effects of season on the yield and quality of agar from *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) from Mostaganem, Algeria. **African journal of biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 350-355, 2016.

NISHINARI, K; FANG, Y. Relation between structure and rheological/thermal properties of agar. A mini-review on the effect of alkali treatment and the role of agaropectin. **Food structure**, [s. l.], v. 13, p. 24-34, 2017.

NISHINO, T.; NAGUMO, T. The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydrate Research**, [s. l.], 1991, 214, 193–197.

OLASEHINDE, T.A. *et al.* Chemical characterization, antioxidant properties, cholinesterase inhibitory and anti-amyloidogenic activities of sulfated polysaccharides from some seaweeds. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s. l.], p. 100182, 2019.

OLIVEIRA, L. S. *et al.* The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata*) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 151-160, 2011.

OLIVEIRA, E. C.; ALVEAL, K.; ANDERSON, R. J. Mariculture of the agar-producing Gracilarioid red algae. **Reviews in fisheries science**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 345-377, 2000.

OLIVEIRA, E. C. *et al.* Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro:

diversidade, exploração e conservação. In: **Workshop sobre Avaliação e ações prioritárias para a conservação da Biodiversidade das zonas costeira e marinha**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 411-416, 2002.

OLIVEIRA, E. C. **Introdução a biologia vegetal**. 2ed, Edusp: São Paulo, 2003.

O'NEILL, A. N. Derivatives of the polysaccharides 4-O- β -D-Galactopyranosyl-3, 6-anhydro-D-galactose from κ -Carrageenin1. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 77, n. 23, p. 6324-6326, 1955.

OUSEY, K.; CUTTING, K. Wound healing and hyper-hydration-a counter intuitive model. **Journal of wound care**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 68-75, 2016.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: **The polysaccharides**. Academic Press, p. 195-285, 1983.

PANTOPOULOS, K. *et al.* Mechanisms of mammalian iron homeostasis. **Biochemistry**, [s. l.], v. 51, n. 29, p. 5705-5724, 2012.

PARK, P.J. *et al.* Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 651-656, 2001.

PATEL, S. Seaweed-derived sulfated polysaccharides: Scopes and Challenges in Implication in Health Care. **Bioactive Seaweeds for Food Applications**. [s. l.], p. 71-93, 2018

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

PERCIVAL, N. J. Classification of wounds and their management. **Surgery**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 114-117, 2002.

PEREIRA, L. *et al.* Vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman)-a rapid and useful tool for phycocolloid analysis. In: **BIODEVICES 2009-Proceedings of the 2º International Conference on Biomedical Electronics and Devices**. 2011.

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M.; MELO, M. R.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.

PEREIRA, L. *et al.* Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 223-228, 2003.

PETERS, M.M.C.G. *et al.* Glutathione conjugates of tert-butyl-hydroquinone, a metabolite of the urinary tract tumor promoter 3-tert-butyl-hydroxyanisole, are toxic to kidney and bladder. **Cancer research**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 1006-1011, 1996.

POMIN, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review.

Glycoconjugate journal, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1-12, 2010.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P.A.S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 2008.

POMIN, V. H. Unravelling glycobiology by NMR spectroscopy. In: **Glycosylation**. IntechOpen, 2012.

PORSE, H.; RUDOLPH, B.. The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 2187-2200, 2017.

PRAIBOON, J. *et al.* Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the Thai and Japanese species of *Gracilaria*. **Science Asia**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 11-17, 2006.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K.. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

QI, H. *et al.* Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 195-199, 2005.

QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 321-339, 2001.

QUINDERÉ, A.L.G. *et al.* Is the antithrombotic effect of sulfated galactans independent of serpin?. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 43-53, 2014.

RAO, M.A.A. **Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications**. Springer Science & Business Media, 2010.

RAMSEY, D. T. *et al.* Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American journal of veterinary research**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 941-949, 1995.

RAO, M.A.A. **Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications**. Springer Science & Business Media, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, SUSAN E. **Biologia Vegetal**, 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

REN, L. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 41-51, 2014.

REVEL, T.; DOGHMI, K. Physiologie de l'hémostase. **EMC. Odontologie**. [s. l.], v. 1, p. 71-

81, 2004.

RHEIN-KNUDSEN, N. *et al.* Rheological properties of agar and carrageenan from ghanaiian red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 63, p. 50-58, 2017.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Natural products from marine seaweeds and their antioxidant potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.

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

RODIL, R. *et al.* Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, [s. l.], v. 1217, n. 41, p. 6428-6435, 2010.

RODRIGUES, J.A.G. *et al.* Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum. Technology**, [s. l.], v. 33, n. 2, 2011.

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

SAITO, M.; SAKAGAMI, H.; FUJISAWA, S. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). **Anticancer research**, [s. l.], v. 23, n. 6C, p. 4693-4701, 2003.

SAKAI, A.; MIYATA, N.; TAKAHASHI, A. Initiating activity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (3-BHA) and its metabolites in two-stage transformation of BALB/3T3 cells. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1985-1988, 1990.

SANZ, M.M. *et al.* Production of unpurified agar-based extracts from red seaweed *Gelidium sesquipedale* by means of simplified extraction protocols. **Algal Research**, [s. l.], v. 38, p. 101420, 2019

SATO, A.C.K.; CUNHA, R.L. Influence of temperature on the rheological behavior of jaboticaba pulp. **Food Science and Technology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 890-896, 2007.

SCHAFER, S. E.; STEVENS, E. S. A reexamination of the double-helix model for agarose gels using optical rotation. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 103-108, 1995.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 308-13, 2004.

SCHOTT, H. Reologia. In : GENNARO, A. R. **Remington: Farmácia**, Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana, v.2, p. 461, 1992.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. Artliber Ed., 2006.

SCHUCK, Paulo Henrique. **Análise das características reológicas no escoamento de misturas utilizadas no tratamento preventivo do cultivo da soja**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

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

SEN, C. K., *et al.* Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy, **Wound Repair and Regeneration**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 763-771, 2009.

SERENA, T. E. A global perspective on wound care. **Advances in wound care**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 548-552, 2014.

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

SILLER-SÁNCHEZ, A. *et al.* biorefinery approach for red seaweeds biomass as source for enzymes production: food and biofuels industry. In: **Green Bio-processes**. Singapore: Springer, 2019.

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

SITI, H.N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular pharmacology**, [s. l.], v. 71, p. 40-56, 2015.

SKRIPTSOVA, A. V.; NABIVAILO, Y. V. Comparison of three gracilarioids: growth rate, agar content and quality. **Journal of applied phycology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 443-450, 2009.

SOLOMONS, T. W.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica 1**. LTC, 2006.

SOUSA, A. M. M. *et al.* Structural, physical, and chemical modifications induced by microwave heating on native agar-like galactans. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s. l.], v. 60, n. 19, p. 4977-4985, 2012.

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

SOUZA, B. W. S *et al.* Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 287-292, 2012.

STANLEY, N.F. Agars. **Food polysaccharides and their applications**, p. 217, 2006.

STEGHENS, J. P. *et al.* Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.

SUN, T. *et al.* Degradation and antioxidant activity of κ -carrageenans. **Journal of applied polymer science**, [s. l.], v.117, n. 1, p. 194-199, 2010.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. Freeman Press, 1996.

STORTZ, C. A.; CERREZO, A. S. Novel findings in carrageenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **ChemInform**, [s. l.], v. 33, n. 15, p. no-no, 2002.

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

TANG, L *et al.* Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia livida*. **International journal of biological macromolecules**, [s. l.], v. 94, p. 642-652, 2017.

TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 343-362, 2012.

TELLO-IRELAND, Cristian *et al.* Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. **LWT-Food Science and Technology**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 2112-2118, 2011.

THAKUR, V. K.; THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 72, p. 834-847. 2015.

THOMPSON, D.; MOLDEÚS, P. Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. **Biochemical pharmacology**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 2201-2207, 1988.

TOLEDO, R.T.; SINGH, R.K.; KONG, F. **Fundamentals of food process engineering**. New York, NY: Springer, 2007.

TORRES, P.; SANTOS, J. P.; CHOW, F.; DOS SANTOS, D. Y. A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). **Algal research**, v. 37, p. 288-306, 2019

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. In: **Microbiologia**. 2012.

TURNLUND, J. R., FRIBERG, L. T. Molybdenum. In **Handbook on the Toxicology of Metals**, 2007, pp. 731-741.

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

- USOV, A.I. Polysaccharides of the red algae. In: **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. Academic Press, 2011. p. 115-217.
- USOV, A.I.; BILAN, M.I. Review – fucoidans – sulfated polysaccharides of brown algae. **Russian Chemical**, [s. l.], v. 78, n. 8, p. 785-799, 2009.
- USOV, A.I.; YAROTSKY, S.V.; SHASHKOV, A.S. ¹³C-nmr spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 977-990, 1980.
- VALIENTE, O. *et al.* Agar polysaccharides from the red seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kützing and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. **Botanica marina**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 77-82, 1992.
- VAN DE VELDE, F. *et al.* ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 73-92, 2002.
- VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H.S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, [s. l.], v. 339, n. 13, p. 2309-2313, 2004.
- VAN DER WAL, H. *et al.* Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. **Bioresource technology**, [s. l.], v. 128, p. 431-437, 2013.
- VANDERLEI, E.S.O. *et al.* The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 1121-1130, 2011.
- VASCONCELOS, A. G.; DE ARAÚJO, K. V.; SANTANA, L. A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 2236-1103, 2015.
- VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S. Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s. l.], v. 125, n. 3, p. 147-157. 2005.
- VIDOTTI, E. C; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.
- VENUGOPAL, V. Applications of marine polysaccharides in food processing. **Enzymatic Technologies for Marine Polysaccharides**, [s. l.], v. 7, p. 25, 2019.
- VILLANUEVA, R. D. *et al.* Production and properties of agar from the invasive marine alga, *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 211-220, 2010.
- WANG, H. *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The lancet**, [s. l.], v. 388, n. 10053, p. 1459-1544, 2010.

WANG, Z. *et al.* Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities. **Trends in food science & technology**, [s. l.], v. 74, p. 147-157, 2018.

WATASE, M.; NISHINARI, K. Effect of alkali metal ions on the viscoelasticity of concentrated kappa-carrageenan and agarose gels. **Rheologica acta**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 318-324, 1982.

WEI, N.; QUARTERMAN, J.; JIN, Y.S. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. **Trends in biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 70-77, 2013.

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

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Introduction to food hydrocolloids. In: **Handbook of hydrocolloids**. Woodhead Publishing, p. 1-22, 2009.

YANG, L.; ZHANG, L.M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 349-361, 2009.

YU, Y. *et al.* Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 183, p. 91-101, 2018.

ZHAO, J. *et al.* Anticoagulant activity and structural characterization of polysaccharide from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) gonad. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 697, 2016.

APÊNDICE A – ARTIGOS

Esta trabalho gerou os seguintes artigos publicados a submetidos a periódicos:

1 - Polysaccharides of red alga *gracilaria intermedia*: structure, antioxidant activity and rheological behavior (2018) – Revista Polímeros - <http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.013116> O

Neste trabalho, foram utilizados dados da caracterização estrutural de PGI, como composição monossacarídica.

2 - Hydrolised and oversulfated polysaccharide from *Gracilaria intermedia*: chemical structure and antioxidant activity (2019) - Food and Bioprocess Technology

Este trabalho já está submetido e sob revisão do periódico, foi realizado com os dados estruturais e resultados antioxidantes de PGI com modificações estruturais.

3 - Prospecção de produtos a base de hidrogéis de ágar (2018) – Revista INGI

Este artigo publicado é resultante da pesquisa de levantamento de patentes realizada.