



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

JOSÉ GABRIEL DE SOUSA CÂNDIDO

**ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE OS EFEITOS ANTIOXIDANTE E
ANTICOAGULANTE DOS POLISSACARÍDEOS DA RODOFÍCEA *Gracilaria cuneata***

FORTALEZA

2022

JOSÉ GABRIEL DE SOUSA CÂNDIDO

ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE OS EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTICOAGULANTE
DOS POLISSACARÍDEOS DA RODOFÍCEA *Gracilaria cuneata*

Trabalho supervisionado – Modalidade A –
Monografia – submetido ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias
da Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

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

FORTALEZA

2022

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)

C223e Cândido, José Gabriel de Sousa.
Estudos preliminares sobre os efeitos antioxidante e anticoagulante dos polissacarídeos da rodófitca
gracilaria cuneata / José Gabriel de Sousa Cândido. – 2022.
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. Anticoagulante. 2. Antioxidante. 3. Gracilaria cuneata. I. Título.

CDD 639.2

JOSÉ GABRIEL DE SOUSA CÂNDIDO

ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE OS EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTICOAGULANTE
DOS POLISSACARÍDEOS DA RODOFÍCEA *Gracilaria cuneata*

Trabalho supervisionado – Modalidade A –
Monografia – submetido ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias
da Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial à obtenção do título de Engenheiro de Pesca.
Área de concentração: Biotecnologia marinha.

Aprovada em: 09/02/2022

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene S. De Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

M.Sc Poliana de Oliveira C. Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Isaías 60:22

A minha vizinha (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço, a **Deus**, por ter dado forças para seguir firme na caminhada e por nunca me permitir desistir dos meus objetivos.

À minha orientadora, **Profª Ana Lúcia Pontes Freitas** e ao meu co-orientador **Francisco Diêgo da Silva Chagas**, por terem me dado a oportunidade de trabalhar com eles, pelo compromisso, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e por todo o carinho que ambos sempre demonstraram por mim. Vocês são a minha inspiração, tanto para o lado pessoal quanto profissional.

Aos membros da banca, **Profº Bartolomeu Warlene Silva de Souza** e a **Poliana de Oliveira Cavalcante Alencar**, por todas as contribuições e pela disponibilidade em participar da minha banca de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso.

Aos meus amigos do Laboratório de Algas Marinhas, **Ana Paula Cavalcante César** e a **Ana Caroline dos Reis Silva**, pela ajuda na pesquisa e por todos os momentos, o trabalho foi bem mais leve e divertido.

A minha amiga, **Gisele dos Santos de Oliveira**, por sempre ter acreditado em mim. Você é luz na minha vida desde 2012. Você é uma pessoa incrível! Eu te falei que íamos conseguir!!!

Aos meus amigos do curso de Engenharia de Pesca, **Raysa Pâmela, Pedro Arthur, Thifany Saldanha, Davi Cerqueira, Levy Sobreira, Ana Karoline, Pedro Anderson, Gabriel Lourenço** e **Renato Farias**, pela ajuda nas disciplinas, no dia a dia e pelos momentos de descontração. Vou levar vocês para sempre comigo.

A minha mãe, **Maria Salete de Sousa**, por ter sido a minha inspiração, meu guia, minha força e por ter sido o fôlego das minhas manhãs chuvosas para sair de casa às 6 horas. Esse diploma é nosso. Todas essas conquistas são para você, sem você eu não teria chegado até aqui.

Aos meus irmãos, sobrinhos, e familiares, **Danielle Cândido, Samuel Cândido, Ronielle Cândido, Maria Eduarda, Daniel Eric, Érica Maria** e **Carlos Eduardo**. Vocês são

maravilhosos e sempre me deram forças para seguir em frente.

À Central Analítica, da Universidade Federal do Ceará, pelo auxílio na caracterização morfológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria cuneata*.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), ao Programa de Educação Tutorial do curso de Engenharia de Pesca-UFC e à Pró-Reitoria de Assuntos pela moradia e auxílio financeiro.

RESUMO

As algas marinhas são fontes naturais de compostos bioativos, especialmente os carboidratos. Os polissacarídeos sulfatados são moléculas complexas que são utilizadas amplamente na indústria farmacêutica e alimentícia. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito anticoagulante e antioxidante *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria cuneata* (PSGc). A composição centesimal do material *in nature* revelou umidade: 1,7%; cinzas: 10,4%; proteínas: 9,5%; lipídeos: 0,24%. As análises químicas resultaram 87,37% de açúcares totais e foram detectados apenas traços de contaminantes proteicos (<1 %). Além disso, a análise dos microelementos realizada através do MEV/EDS revelou teores de carbono (46,4%), oxigênio (46,0%) e enxofre (2,9%). Outrossim, através do MEV foi possível verificar a estrutura morfológica dos PSGc, revelando que os PSGc possuem morfologia laminada, cadeias ramificadas e topografia lisa. Os PSGc não apresentaram efeito significativo sob os testes de Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPA) e Tempo de Protrombina (TP). Entretanto, os PSGc apresentaram na atividade antioxidante *in vitro* revelando efeito concentração-dependente nos testes do sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (54,3 %; 4 mg/mL), ensaio de quelação do íon ferroso (83,05 %; 4 mg/mL) e ensaio da capacidade antioxidante total (60,80 %; 4 mg/mL). Diante do resultado preliminar, os polissacarídeos obtidos da rodófito *Gracilaria cuneata* podem ser caracterizados e ter seus efeitos avaliados *in vivo*, visando uma aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia.

Palavras-chaves: anticoagulante, antioxidante, *gracilaria cuneata*.

ABSTRACT

Seaweeds are natural sources of bioactive compounds, especially carbohydrates. Sulfated polysaccharides are complex molecules that are widely used in the pharmaceutical and food industries. The present work aimed to investigate the in vitro anticoagulant and antioxidant effect of sulfated polysaccharides from the seaweed *Gracilaria cuneata* (cPSG). The proximate composition of the material in nature revealed moisture: 1.7%; ash: 10.4%; proteins: 9.5%; lipids: 0.24%. Chemical analysis resulted in 87.37% of total sugars and only traces of protein contaminants were detected (<1%). Furthermore, the analysis of microelements carried out through SEM/EDS revealed carbon (46.4%), oxygen (46.0%) and sulfur (2.9%) contents. Furthermore, through SEM it was possible to verify the morphological structure of cPSG, revealing that cPSG have laminated morphology, branched chains and smooth topography. cPSG had no significant effect under Partially Activated Thromboplastin Time (APTT) and Prothrombin Time (PT) tests. However, cPSG showed antioxidant activity in vitro, revealing a concentration-dependent effect in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging tests (54.3 %; 4 mg/mL), ferrous ion chelation assay (83.05%; 4 mg/mL) and assay of the total antioxidant capacity (60.80%; 4 mg/mL). In view of the preliminary result, the polysaccharides obtained from the rhodophyte *Gracilaria cuneata* can be characterized and their effects evaluated in vivo, aiming at an application in the pharmaceutical and food industry.

Keywords: anticoagulant, antioxidant, *cuneata gracilaria*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Aspecto macroscópico da alga marinha <i>Gracilaria cuneata</i> e sua classificação taxonômica	18
Figura 02 – Representação do método de extração enzimática dos polissacarídeos sulfatados da <i>Gracilaria cuneata</i> (PSGc).....	22
Figura 03 – Representação do método de quantificação dos carboidratos	23
Figura 04 – Representação do método de quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes	24
Figura 05 – Representação gráfica dos valores referentes aos elementos químicos presentes nos PSGc.....	31
Figura 06 – Características morfológica dos polissacarídeos sulfatados da <i>Gracilaria cuneata</i>	32
Figura 07 – Efeito dos PSGc no sequestro do radical DPPH.....	34
Figura 08 – Atividade dos PSGc na quelação do íon ferroso.	35
Figura 09 – Capacidade antioxidante total dos PSGc	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Composição centesimal de algas marinhas.....	28
Tabela 02 – Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados da <i>Gracilaria cuneata</i>	31
Tabela 03 – Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha <i>Gracilaria cuneata</i> avaliada pelo teste do TTPA	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	<i>Objetivo geral</i>	17
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Coleta e identificação da alga	18
3.2	Composição centesimal da alga <i>in nature</i>	18
3.2.1	<i>Determinação da umidade</i>	18
3.2.2	<i>Determinação de cinzas</i>	19
3.2.3	<i>Determinação de proteínas</i>	19
3.2.4	<i>Determinação de lipídios</i>	20
3.3	Extração e purificação dos polissacarídeos sulfatados	21
3.4	Rendimento	22
3.5	Determinações dos teores de carboidratos solúveis e proteínas contaminantes	23
3.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
3.7	Atividade anticoagulante <i>in vitro</i>	25
3.7.1	<i>Tempo de tramboplastina parcialmente ativada (TTPA) e Tempo de protrombina (TP)</i>	25
3.8	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	25
3.8.1	<i>Sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)</i>	25
3.8.2	<i>Ensaio de quelação do íon ferroso (QIF)</i>	26
3.8.3	<i>Ensaio da capacidade antioxidante total (CAT)</i>	26
3.9	Análise estatística	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Composição centesimal	28
4.2	Extração e purificação dos polissacarídeos sulfatados	29
4.3	Determinações dos teores de carboidratos solúveis e proteínas contaminantes	29
4.4	Análise dos elementos químicos presentes no PSGc	30

4.5	Características da superfície dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>G. cuneata</i>.....	SUMÁRIO.....	31
4.6	Atividade anticoagulante <i>in vitro</i>.....		33
4.7.	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>.....		34
4.7.1	<i>Sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)</i>.....		34
4.7.2	<i>Ensaio de quelação do íon ferroso (QIF)</i>.....		35
4.7.3	<i>Ensaio da capacidade antioxidante total (CAT)</i>.....		35
5	CONCLUSÃO.....		37
	REFERÊNCIAS.....		38

1 INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é único e possui uma grande diversidade de organismos. Diante disso, os organismos marinhos, como invertebrados, esponjas e algas marinhas são fontes exclusivas de moléculas que podem alavancar o desenvolvimento de novos (VAIKUNDAMOORTHY *et al.*, 2018) (SHINDE, BANERJEE, MANDHARE, 2019),

As macroalgas marinhas são um grupo de seres que possuem uma abundância de compostos bioativos. As algas são organismos eucarióticos, fotoautotróficos, e fazem parte do Reino Protista (FRANCHESCHINI *et al.*, 2009).

As algas ocupam principalmente o ambiente marinho, sendo que apenas 3% tem ocorrência em ambientes de água doce. Além disso, compõem um dos grupos taxonômicos com uma vasta variedade de espécies (GRAHAM *et al.*, 2009). Cerca de 8000 espécies de algas marinhas foram catalogadas e divididas em diferentes grupos, incluindo algas marrons (Phaeophyceae), verdes (Chlorophyta) e vermelhas (Rhodophyta). As macroalgas vermelhas se destacam por suas propriedades farmacológicas já estabelecidas, destacando-se atividade antioxidante (ALENCAR *et al.*, 2019) e anticoagulante (CHAGAS *et al.*, 2020)

As algas são usadas há muito tempo como fonte de alimento, suplementos alimentares e para fins medicinais em vários países asiáticos. Diante dos crescentes estudos, seus benefícios atraíram recentemente a atenção de muitos países europeus e ocidentais (TANNA; MISHR, 2019).

No Brasil e em grande parte dos ecossistemas costeiros tropicais e subtropicais, as algas vermelhas representam mais de 60% das macroalgas que ocorrem nos oceanos. A ordem *Gracilariales* compreende um grupo de macroalgas marinhas vermelhas que são abundantes e apresentam grande importância na área alimentícia e farmacêutica. Isso devido às suas propriedades físicas de seus ficocolóides, que atuam como gelificantes, espessantes e estabilizantes de uma gama de produtos (ARIFFIN *et al.*, 2014).

A espécie *Gracilaria cuneata* ocorre predominantemente no nordeste brasileiro, apresenta talo foliáceo com textura coriácea, geralmente não passam de 5 cm de altura, 8 mm de largura e tem coloração alaranjada. As algas do gênero *Gracilaria* são utilizadas na culinária mundial, sobretudo, no continente asiático.

As algas são seres ricos em carboidratos aniônicos, que são

macromoléculas que podem ser encontradas tanto na parede celular das algas quanto em invertebrados (MOURÃO *et al.*, 1996).

Os polissacarídeos sulfatados são denominados galactanas, devido à predominância do monossacarídeo galactose na sua constituição. Quanto à caracterização estrutural, as galactanas são formadas pela repetição das unidades dissacarídicas (A e B) e são classificadas de acordo com a estereoquímica de suas moléculas, especialmente relacionada com a unidade B. Quando a referida unidade pertence à série D, a galactana é considerada uma carragenana e quando pertence a série L, é chamada de agarana (PEREZ-RECALDE *et al.*, 2016).

Devido às características químicas, as galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas apresentam uma série de atividades biológicas descritas na literatura. Essas atividades possuem destaque com efeitos anti-inflamatório, anticâncer, antibacteriano, antidiabético, antioxidante, antiviral, gastroprotetor, imunomodulador e anticoagulante (MANLUSOC *et al.*, 2019).

Vários estudos têm evidenciado que os polissacarídeos sulfatados das algas marinhas têm apresentado um grande potencial antioxidante contra os radicais livres. Além disso, o uso dessas moléculas podem impedir danos oxidativos, e por conseguinte, promover uma forte ação para a manutenção da homeostase sanguínea, que se caracteriza como a resposta fisiológica do corpo humano

No cenário brasileiro, em 2019, mais de um milhão de mortes (1.314.103) foram registradas, com um total de 289 mil óbitos ocasionados por doenças cardiovasculares (BRASIL, 2019). As doenças cardiovasculares continuam sendo uma das principais causadoras de mortes no mundo, mesmo com os recentes avanços na área médica/farmacêutica e estudos envolvendo a bioprospecção de novas drogas.

O estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares estão relacionados, visto que o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) diminui a ação do óxido nítrico (NO), retardando sua ação, consequentemente provocando distúrbios no sistema de coagulação e podendo ocasionar o surgimento de doenças tromboembólicas (RITCHIE *et al.*, 2017).

Esse processo ocorre quando há um descontrole na produção de radicais livres e a capacidade do organismo de equilibrar o excesso de oxidantes. Ocorrendo uma grande produção de oxidantes, o sistema antioxidante será incapaz de os radicais livres e podendo ocasionar danos ao organismo, além disto, estão relacionados com o processo de envelhecimento e carcinogênese (KHAN *et al.*, 2020).

Para o tratamento da trombose venosa, são utilizados, predominantemente, anticoagulantes e antitrombóticos. A heparina, um glicosaminoglicano sulfatado, é o principal agente anticoagulante exógeno utilizado na clínica médica. Entretanto, essa droga possui diversas desvantagens que pode provocar situações adversas, como osteopenia (por conta da ligação da heparina a osteoblastos que liberam fatores que ativam o mesmo), hemorragia e contaminação por patógenos animais, pois a heparina é extraída de mastócitos oriundos de pulmões bovinos e mucosa intestinal de suínos (ARATA *et al.*, 2015; VASCONCELLOS, 2018).

Diante disso, pesquisadores de todo o mundo têm realizado estudos visando a prospecção de novas moléculas que possam ser uma alternativa ao uso da heparina. Logo, faz-se necessário novos estudos sobre a caracterização e investigação dos efeitos biológicos dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas. Uma vez que, os polissacarídeos da agarófita *Gracilaria cuneata* ainda não foram caracterizados e nem seus efeitos sobre o sistema anticoagulante e antioxidante foram investigados.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito anticoagulante e antioxidante *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria cuneata* (PSGc).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição centesimal da alga *in nature*;
- Isolar os polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria cuneata*;
- Quantificar os teores de carboidratos solúveis e proteínas contaminantes;
- Analisar os elementos químicos presentes nos PSGc;
- Determinar as características da superfície dos PSGc;
- Avaliar o potencial anticoagulante *in vitro*;
- Avaliar o efeito dos PSGc quando a sua atividade antioxidante *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação da alga marinha

A alga coletada possui registro no SisGen sob número A482D49, com acesso livre à coleta e ao uso, como previsto na Lei nº 13.123/2015. O exemplar da alga marinha vermelha *Gracilaria cuneata* foi coletado durante o período de maré baixa (-0.1 a 0.2 m) na praia do Taíba, município de São Gonçalo do Amarante, litoral cearense. As espécimes coletados foram transportados ao Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC) em recipiente isotérmico, os mesmos foram lavados em água corrente, removidas as epífitas e estocados a -20 °C para posterior utilização. A alga foi catalogada no herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o seguinte número EAC 64700. O aspecto macroscópico da alga e sua classificação taxonômica podem ser evidenciadas na figura 01.

Figura 01: O aspecto macroscópico da alga marinha *Gracilaria cuneata* e sua classificação taxonômica.



Filo	Rodhophyta
Classe	Florideophyceae
Ordem	Gracilariales
Família	Gracilariaceae
Gênero	<i>Gracilaria</i>
Espécie	<i>Gracilaria cuneata</i>

Fonte: autor e AlgaBase.

3.2 Composição centesimal da alga marinha *Gracilaria cuneata in nature*

3.2.1 Determinação da umidade

A determinação da umidade foi baseada na técnica descrita por (NAGAKURA, 1972), utilizando balança analítica, dessecador e estufa. Foram utilizados 5 g da biomassa algal *in natura* devidamente homogeneizada. O material foi colocado em estufa com temperatura entre 100 a 105 °C por 24 h. Após esse período, o material foi pesado outra vez. O resultado da umidade foi dado pela diferença entre o peso inicial do material e o peso final.

Foi usada a seguinte equação:

$$\% U = \frac{v_1 - v_0}{v_2 - v_0} \times 100$$

Onde:

U - umidade;

V₀ - peso do cadinho vazio;

V₁ - peso do cadinho com a amostra;

V₂ - peso do cadinho com a amostra após secagem.

3.2.2 Determinação de cinzas

O teor de cinzas foi determinado com o auxílio de um cadinho de porcelana, estufa, balança analítica, dessecador e mufla. Um quantitativo de 5 g de cada amostra usada na determinação de umidade foi utilizado cadinho previamente tarados e posteriormente transferidos para mufla, a 555 °C, por 4 horas. Depois desse tempo, os cadinhos de porcelana, em temperatura ambiente, foram pesados novamente (AOAC, 2010).

Utilizada a seguinte equação:

$$\% C = \frac{v_1 - v_0}{v_2 - v_0} \times 100$$

Onde:

C - Cinzas;

V₀ - peso do cadinho vazio;

V₁ - peso do cadinho mais cinzas;

V₂ - peso do cadinho com a amostra.

3.2.3 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas foi baseada no método de Micro-Kjeldahl, utilizando uma folha de papel vegetal com 0,2 g da amostra, onde foi acondicionada em tubos com 2 g do catalisador, contendo uma solução de sulfato de potássio

(K₂SO₄), sulfato de cobre (CuSO₄) e selênio metálico (Se), e foi adicionado 4 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Em seguida, os tubos foram levados ao aparelho digestor a 350 °C. Após observar a digestão, a amostra foi neutralizada, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) a 50%, até surgir uma coloração escura. A mistura foi destilada por meio do arraste de vapor e o produto (destilado) foi recolhido em erlenmeyer com 10 mL da solução de ácido bórico (H₃BO₃) a 2%, onde foram colocadas 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol), até completar 50 mL. Desta forma, a mistura destilada foi titulada com solução padrão de ácido clorídrico (HCl) a 0,04 N em bureta até a coloração rosada (AOAC, 2010).

Foi usada a seguinte equação:

$$\% NT = \frac{(\text{volume da amostra} - \text{volume do branco}) \times 0,014 \times 0,04}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

Onde:

NT - Nitrogênio Total;

Para a conversão de nitrogênio total em proteína total, foi determinada através da seguinte equação:

$$\% PT: \% NT \times 6,25$$

Onde:

PT – Proteína Total.

3.2.4 Determinação de lipídios

O teor de lipídios foi determinado através do método de Soxhlet. Foi utilizado dessecador, estufa, papel filtro, aparelho determinador de gordura e balões volumétricos. Foi usado como solvente orgânico acetona para extração dos lipídios. Os balões foram colocados em uma estufa a 100 °C por 1 hora. Logo após esse tempo, eles foram levados ao dessecador até atingir a temperatura ambiente (25 °C) e pesados. Foi utilizado 3 g da amostra desidratada foi macerada e pesada. Em seguida colocadas nos cartuchos de extração e vedados com algodão. Os balões contendo 100 mL do solvente orgânico foram levados para o determinador de

gordura por 2 horas a 90 °C. Depois desse tempo, a amostra ficou gotejando por cerca de meia hora, a 150 °C. Os balões contendo lipídios ficaram no dessecador até o solvente evaporar e atingir temperatura ambiente (25°C) para serem pesados (AOAC, 2010).

Foi utilizada a seguinte equação:

$$\% L = \frac{(\text{peso do balão com a gordura} - \text{peso do balão vazio})}{\text{peso da amostra}} \times 100$$

Onde:

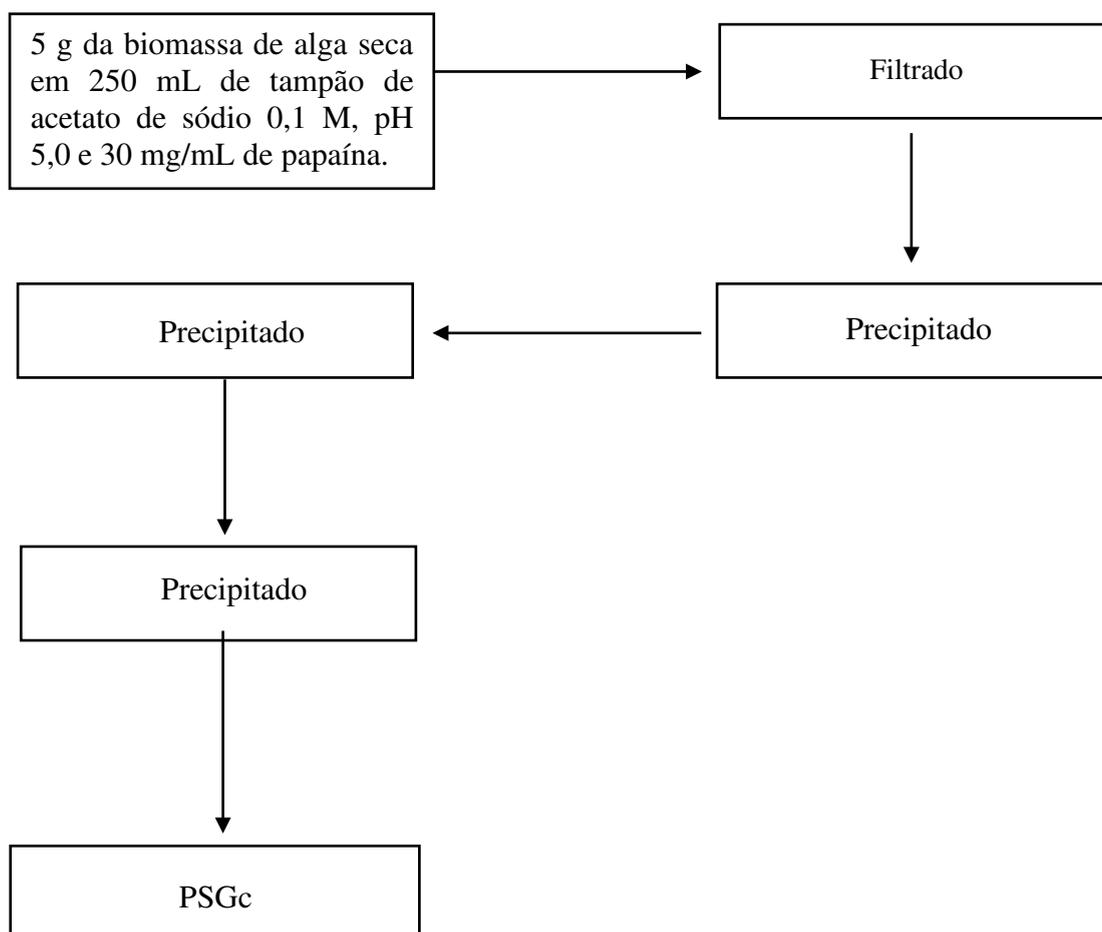
L - Lipídios

3.3 Extração e purificação dos polissacarídeos sulfatados

A extração dos polissacarídeos sulfatados foi realizada de acordo com Farias *et al.*, (2000), com algumas modificações. Primeiramente, a alga foi desidratada em temperatura ambiente e macerada. Após maceração, 5 g da alga foi colocada em contato com 250 mL do tampão de extração acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM para ser digerida com 510 mg de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL) por 6 horas a 60 °C em banho-maria. Em seguida, o material foi filtrado em malha fina e centrifugado (7965 x g; 20 min; 25 °C). Os polissacarídeos sulfatados presente no sobrenadante do material centrifugado foram precipitados por adição de 16 mL de uma solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CPC) e mantidos por 24 horas, a 25 °C. Após este período, o material foi novamente centrifugado (7965 x g; 20 min; 25 °C) e o sobrenadante descartado. O extrato precipitado foi lavado com 200 mL de solução a 0,05% de CCP, centrifugado (7965 x g; 20 min; 25 °C) e depois dissolvido em 100 mL de solução NaCl 2 M:etanol P.A (100:15; v/v). Os polissacarídeos sulfatados foram novamente precipitados com adição de 200 mL de etanol comercial por 24 horas a 4 °C. Após a precipitação, o material foi novamente centrifugado (7965 x g; 20 min; 25 °C) e submetido a duas lavagens com 200 mL etanol P.A diluído a 80% e uma vez com 200 mL etanol comercial, seguido de centrifugação (7965 x g; 20

min; 25 °C). Por fim, o material foi seco com acetona P.A.

Figura 02: Representação do método de extração enzimática dos polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria cuneata*.



Fonte: elaborado pelo autor

3.4 Rendimento

Para cálculo do rendimento dos polissacarídeos sulfatados obtido de *Gracilaria cuneata*, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$T.A = \frac{\text{massa (g) do extrato seco obtido}}{\text{massa (g) seca da macroalga utilizada na extração}} \times 100$$

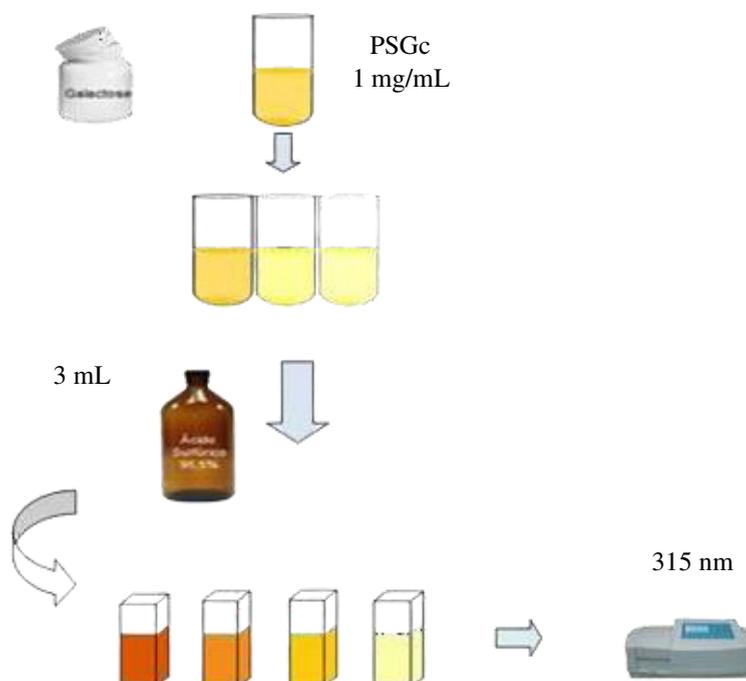
Onde:

T.A: Teor de Ágar

3.5 Determinações dos teores de carboidratos solúveis e proteínas contaminantes

A quantificação do teor de carboidratos totais na amostra foi feita, seguindo o método de Albalasmeh; Berhe; Ghezzehei (2013) com modificações. Os PSGc foram diluídos em água destilada nas proporções de 1:1, 1:10 e 1:20. Em seguida, 3 mL de ácido sulfúrico foi adicionado a 1 mL de cada diluição do PSGc e as soluções resultantes foram colocadas em banho de gelo por 2 min. Por fim, as soluções foram lidas a 315 nm em espectrofotômetro ultravioleta (Biochrom Libra S12). Todas as análises foram realizadas em triplicata (figura 03) e a quantificação do PSGc foi feita através da correlação das leituras obtidas nas amostras e em uma curva de calibração feita com galactose (10 a 90 µg de galactose).

Figura 03: Representação do método de quantificação do conteúdo de carboidratos.

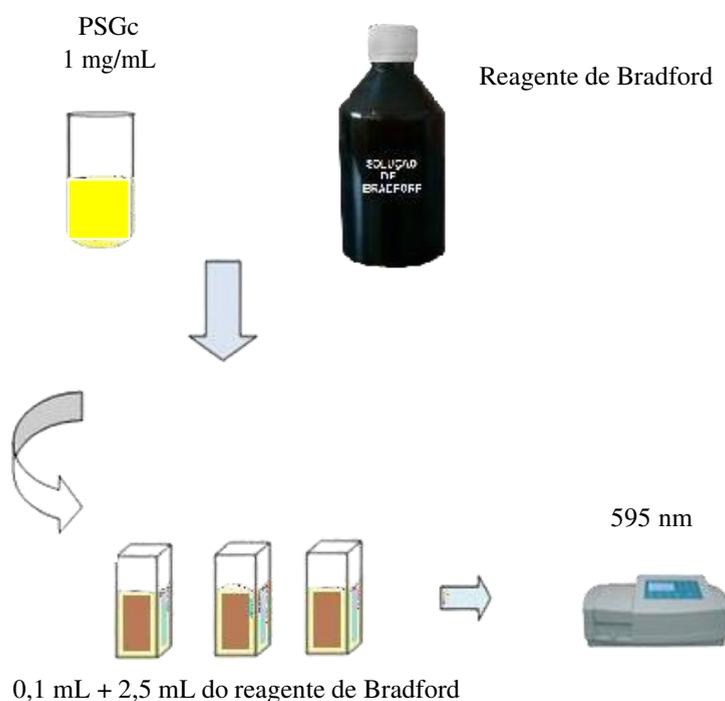


Fonte: autor

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976). Para o preparo da solução de Bradford, 50 mg de Comassie G-250 foi dissolvido em 25 mL de álcool etílico e a solução obtida foi agitada no escuro. Em seguida, foi adicionado 50 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 85% e o volume final da solução foi aferido para 500 mL. Foi utilizado 1,0 mg/mL de polissacarídeo diluído nas seguintes proporções 1:10, 1:50, 1:100. Todas as análises foram realizadas em triplicata

(figura 04). Nas soluções, foi adicionado o reagente de Bradford, as leituras foram leituras em espectrofotômetro (modelo SPECTRONIC® 20 11 GENESYS) a 595 nm. Para a estimativa das concentrações de proteína, foi realizada a correlação entre as leituras obtidas com as soluções contendo a amostra e as leituras da curva padrão, confeccionada com albumina sérica bovina (BSA).

Figura 04: Representação do método de quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes.



Fonte: autor

3.6 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

Os polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria cuneata* foram observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), como descrito por Tang *et al.*, (2017), visando fornecer evidências visuais das características da superfície, determinar os elementos químicos e da microestrutura da amostra. A morfologia da amostra foi avaliada, usando microscópio eletrônico de varredura e a energia que dispersa pelo Raio X (EDS) é responsável pela obtenção de micronálises elementares da amostra. A amostra dos polissacarídeos sulfatados foi seca com acetona da alga *Gracilaria cuneata* e foi revestidos com uma fina camada de ouro e depois examinada sob condições de alto vácuo sob uma tensão de aceleração de

10 kV, usando ampliações de imagem de 200 ×, 500 × e 2000 ×.

3.7 Atividade anticoagulante *in vitro*

3.7.1 Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) e Tempo de protrombina (TP)

Os testes foram realizados em triplicata, seguindo as recomendações do fabricante e analisados em coagulômetro (CLOTimer DRAKE, Brasil). Para realização do teste, foi utilizado plasma comercial e heparina como controle positivo. A atividade anticoagulante foi expressa em segundos, levando em consideração a relação entre o tempo de coagulação em presença (T₁) e ausência (T₀) do PSGc ou heparina.

3.8 Atividade antioxidante *in vitro*

3.8.1 Sequestro do radical 1,1-difenil-2-picrylhidrazil (DPPH)

A capacidade de eliminação de radicais livres de 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), que foi realizada como descrito por Blois (1958). Primeiramente, os polissacarídeos sulfatados (0,5 – 4 mg/mL) foram incubados em uma solução de 3 mL de metanol e DPPH (75 uM) e mantidos durante 30 min a 25 °C na ausência de luz. A absorbância foi medida 517 nm e o hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como controle positivo.

Todas as reações foram realizadas em triplicata e a atividade de eliminação de DPPH foi calculada da seguinte equação:

$$DPPH (\%) = \frac{[A_0 - (A_1 - A_2)]}{A_0} \times 100$$

Onde:

A₀ = DPPH;

A₁ = PSGc ou BHT + DPPH;

A₂ = PSGc ou BHT sem DPPH.

3.8.2 Ensaio de quelação do íon ferroso (QIF)

A capacidade de quelação de íons férricos foi determinada de acordo com o método de Chew *et al.*, (2008). Primeiramente, foram adicionados 1 ml de sulfato ferroso (FeSO₄) (0,1 mM) e 1 mL de ferrozina (0,25 nM) aos polissacarídeos sulfatados (0,5 – 4 mg/mL). Depois de de 10 min a 25 °C, a absorbância da mistura foi medida a 562 nm contra o branco (água destilada e reagentes). O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi utilizado como controle positivo.

Todas as reações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de atividade quelante como mostrado abaixo:

$$QIF (\%) = \frac{[A_0 - (A_1 - A_2)]}{A_0} \times 100$$

Onde A₀ = FeSO₄ + Ferrozina;

A₁ = PSGc ou EDTA + FeSO₄ + Ferrozina,

A₂ = PSGc ou EDTA sem FeSO₄ + Ferrozina.

3.8.3 Ensaio da capacidade antioxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante foi baseada na redução de molibdênio (IV) para molibdênio (V), de acordo com Prieto *et al.*, (1999). Primeiramente, foi adicionado 300 µL de polissacarídeos sulfatados (0,5 – 4 mg/mL à solução de 3 mL de composto, formado pelos seguintes reagentes: solução de molibdato de amônio (NH₄)₆Mo₇O₂₄ (4mM), ácido sulfúrico (H₂SO₄) (0,6 M) e fosfato de sódio (Na₃PO₄) (28 mM). A solução foi incubada por 90 min, a 95 °C. Após esse período, a absorbância da mistura foi lida. O ácido ascórbico (C₆H₈O₆) foi utilizado como controle positivo e o seu potencial antioxidante foi considerado 100% de atividade antioxidante.

Todas as reações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de atividade quelante como mostrado abaixo:

$$\text{CAT (\%)} = \frac{(A_1 - A_2)}{(A_0 - A_2)} \times 100$$

Onde A_0 = Ácido ascórbico;

A_1 = PSGc;

A_2 = Branco.

3.9 Análise estatística

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Composição centesimal alga marinha *Gracilaria cuneata*

A composição centesimal tem como objetivo determinar os componentes específicos de amostras, tais como: umidade, cinzas, proteínas e lipídios. O teor de cinzas está correlacionado com a estabilidade e com a qualidade da amostra. São consideradas matéria. As proteínas estão relacionadas com as propriedades organolépticas e com a textura. O conteúdo de lipídios é bem variável. Os carboidratos estão atribuídos a diversas funções, podendo citar que são responsáveis pelas reações de oxidação (CECCHI, 2007). Os valores obtidos com a composição centesimal da alga *Gracilaria cuneata* são similares aos valores relatados na literatura para algas marinhas, de acordo com a tabela 01.

Tabela 01: Composição centesimal de algas marinhas.

Espécie	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)
Alga em estudo	1,7 ± 0,02	10,4 ± 0,05	9,5 ± 0,02	0,24 ± 0,04	78,16
<i>S. filiformes</i> ^a	15,02	15,12	20,31	0,33	49,18
<i>H. musciformes</i> ^a	14,17	14,14	17,12	0,33	54,24
<i>T. fragilis</i> ^b	20,05	42,29	4,07	0,84	28,76

Fonte: elaborada pelo autor. (a) Carneiro *et al.*, 2012. (b) Banu *et al.*, 2018.

O resultado referente à umidade 1,7% encontrado para o material em estudo, encontra-se dentro da faixa descrita como zona de absorção primária, faixa essa que inclui com umidade inferior a 30% que estão livres da proliferação de microrganismos (BULLERI, 2010), e sugere que o método descrito por (NAGAKURA, 1972) de secagem utilizado foi eficaz. O valor encontrado de umidade foi inferior ao valor encontrado para alga *Hypea musciformis*, que apresentou valor de 14,17 % (CARNEIRO *et al.*, 2012).

A alga marinha *G. cuneata* apresentou 10,4% de conteúdo de cinzas, esse valor encontrado foi inferior ao valor encontrado para a macroalga *Solieria filiformis*, de 15,12% (CARNEIRO *et al.*, 2012). O conteúdo de cinzas está relacionado com a quantidade de minerais. As algas marinhas têm em sua composição cálcio, iodo e magnésio. Grande quantidade de iodo em algumas espécies de algas marinhas pode oferecer risco à saúde de quem as ingere (FLOURENCE *et al.*, 2012). Assim, com o baixo conteúdo de cinzas, o exemplar pode ser uma futura alternativa para utilização humana.

O valor de proteínas que foi encontrado na alga marinha *Gracilaria cuneata* foi de 9,5%. De acordo com a tabela 01, este resultado é maior que o valor encontrado para a alga *Tricleocarpa fragilis*, de 4,07% (BANU *et al.*, 2018). O valor referente a proteínas também é superior ao teor de proteínas encontrado em outros alimentos de origem vegetal, como milho (7,0 a 9,4%) e arroz integral (7,5 a 9,0%) (CECCHI, 2007).

A quantidade de lipídios da alga *Gracilaria cuneata* foi inferior aos valores descritos para algas (1-5%). Esses valores se assemelham com os valores encontrados por CARNEIRO *et al.*, 2012 para as algas *Solieria filiformis* e *Hypea musciformis*, que são 0,33% e 0,33%, respectivamente. Mesmo com baixo teor de lipídios, estudos mostram que as gorduras que são encontradas em algas têm grande valor nutricional, pelo elevado teor de ácidos graxos insaturados e poliinsaturados (TABARSA, REZAEI, RAMEZANPOUR, ROBERTWAALAND, 2012).

4.2 Extração e purificação dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria cuneata*

O método de extração enzimática é comumente utilizado para a obtenção de polissacarídeos de algas marinhas, principalmente por conta do baixo custo e alto rendimento do processo (FARIAS *et al.*, 2000). Foi utilizado 5 g da biomassa seca da macroalga *Gracilaria cuneata* e, após todo o processo de extração, foi obtido 751 mg de polissacarídeo sulfatado, correspondendo a um rendimento de 15,02%. Esse rendimento é superior ao obtido por outras espécies de algas vermelhas como demonstrado por CHAGAS *et al.*, (2020), na qual a alga marinha *Gelidiella acerosa* apresentou um rendimento de 7,1%, utilizando as mesmas condições de extração. Diversos fatores podem afetar o rendimento de polissacarídeos das algas, como metodologia utilizada para a extração, a espécie, o estágio de vida e as variações sazonais (BOURRET *et al.*, 2003). O resultado observado no presente trabalho demonstra que a macroalga *G. Cuneata* apresenta alto rendimento na extração enzimática de polissacarídeos sulfatados.

4.3 Quantificação do conteúdo de carboidratos e quantificação do conteúdo de contaminantes proteicos.

Para quantificar os carboidratos totais, foi confeccionada uma curva padrão de galactose. Através da correlação dos valores obtidos das soluções amostra com os valores da curva padrão, foi observado 87,37 % de carboidratos presentes no PSGc. Em outros estudos com perspectiva semelhante, os polissacarídeos obtidos da macroalga marinha vermelha *Gelidiella acerosa*, apresentou teor de carboidratos de 89,5 % (CHAGAS *et al.*, 2020), e valores semelhantes foi observado por (COSTA *et al.*, 2020) para a macroalga *Gracilaria intermedia* (85%), e em ambos os resultados foi utilizado o mesmo método de extração e de quantificação de carboidratos. Esse alto valor obtido pode estar relacionado ao método de extração enzimática, no qual se faz o uso da papaína, objetivando um maior arraste de polissacarídeos sulfatados das camadas mais internas de célula da alga e assim, melhorando o rendimento.

Para a determinação de proteínas contaminantes, foi confeccionada uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA), e o reagente de Bradford. Foram detectados apenas traços de contaminantes proteicos (< 1%) no PSGc. As baixas quantidade de proteínas são verificadas após o processo de digestão proteica com papaína, de acordo com os trabalhos do nosso grupo de pesquisa (CHAGAS *et al.*, 2020). Assim, corroborando com a metodologia utilizada, pois demonstra a eficiência do método de extração enzimática, evidenciando a pureza do material obtido. Assim, não foi necessário etapas extras de purificação para a obtenção do material de estudo.

4.4 Análise dos elementos químicos presentes no PSGc

A análise dos microelementos do polissacarídeo de *Gracilaria cuneata* foi realizada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e revelou teores de carbono (46,4 %), oxigênio (46,0 %), nitrogênio (não detectado) e enxofre (2,9 %) de acordo com a tabela 2 e com a figura 05. Não foi detectado nitrogênio na amostra, corroborando com a eficiência da extração com auxílio da papaína na eliminação de proteínas.

Tabela 02: Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria cuneata*.

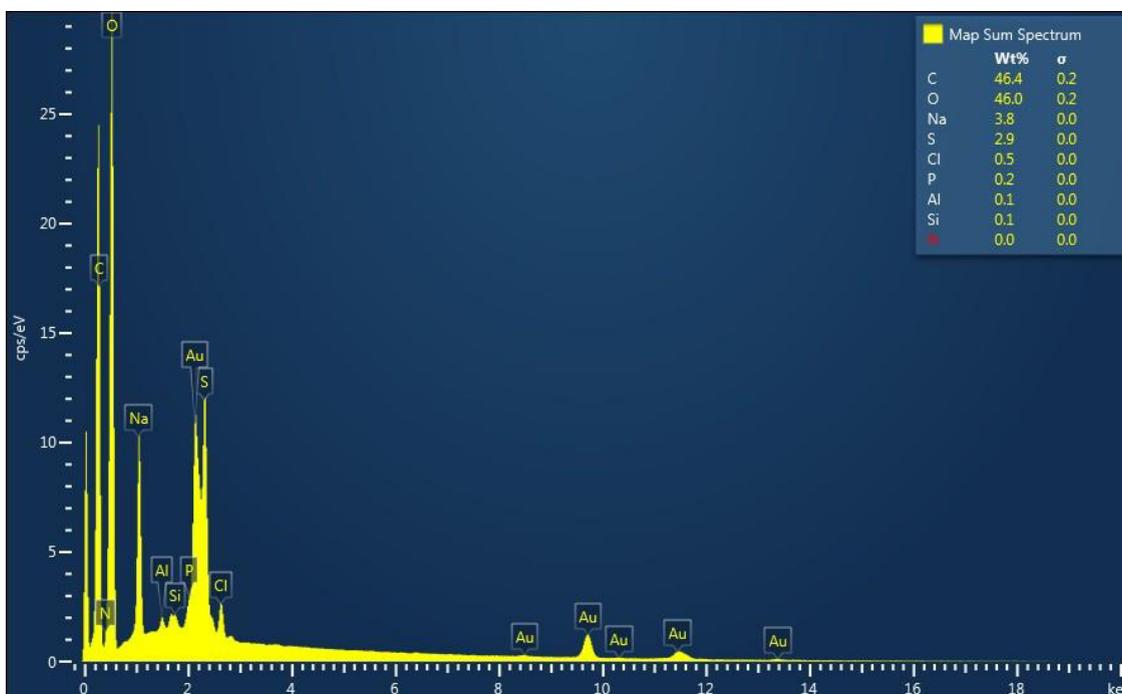
Amostra	Carboidratos (%) ^a	Proteínas (%) ^b	Sulfato (DS) (%)	Análise Elementar (%)			
				C	O	N	S
PSGc	87,37	-	0,28	46,4	46	nd	2,9

Fonte: elaborada pelo autor

^a Determinado de acordo com Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013).

^b Determinado de acordo com Bradford (1976).

C – carbono; O – oxigênio; N- nitrogênio e S – enxofre.

Figura 05: Representação gráfica dos valores referentes aos elementos químicos presentes nos PSGc.

Fonte: Central Analítica -UFC

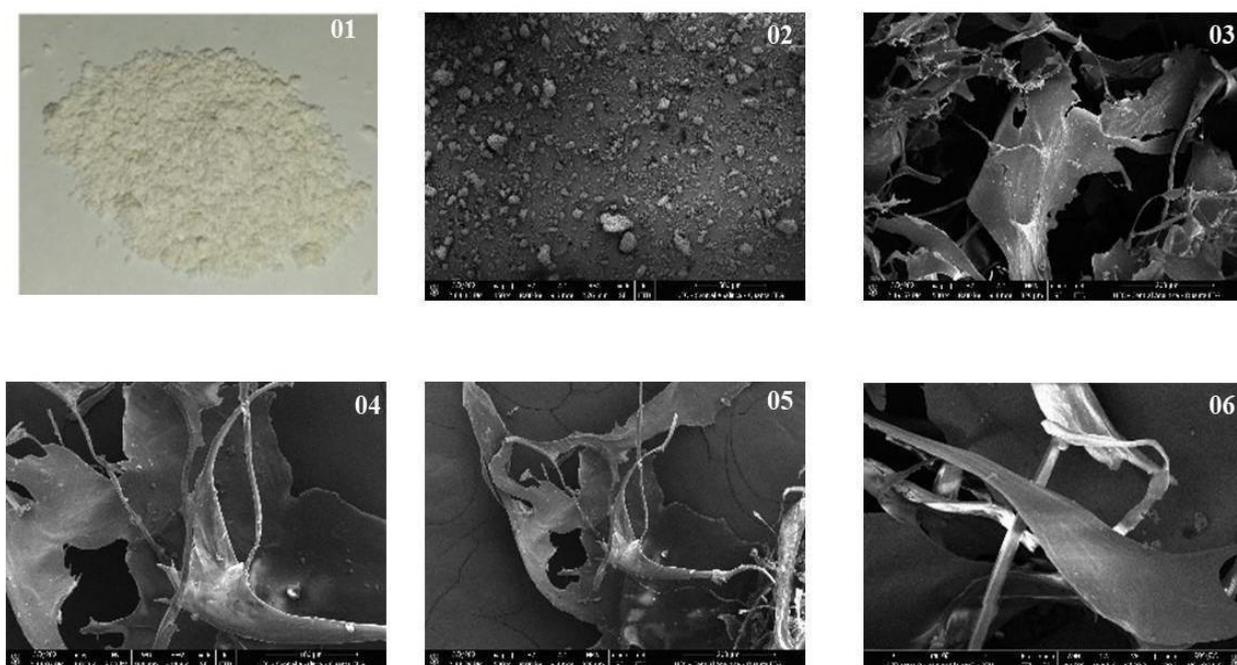
4.5 Características da superfície dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. cuneata*.

As características (figura 06) dos polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria cuneata* foram obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) como descrita por Tang *et al.*, (2017). A fotografia digital 01 representa a forma bruta dos

polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria cuneata*, após a secagem com acetona P.A. As fotografias 02 e 03, e 04 a 06 representam os PSGc nas diferentes ampliações (200x, 500x e 2000x), respectivamente. Pela aparência da imagem 01, podemos ver que os PSGc apresentam uma formação bem rígida, após o processo de secagem. Na imagem 02, a forma rígida ainda permanece, mesmo com ampliação de 200x.

As estruturas dos polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria cuneata* apresentam variação na sua forma. Com a progressão gradual da ampliação (500x e 2000x) mostra a morfologia laminada com algumas cadeias ramificadas e curtas, como pode ser evidenciado nas imagens 03, 04, 05 e 06. Os polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria cuneata* apresentam morfologia laminada, cadeias ramificadas e a topografia lisa pode ser produto da purificação do material (Tang *et al.*, 2017).

Figura 06: Características morfológica dos polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria cuneata*



Fonte: Central Analítica -UFC

4.6 Avaliação do efeito anticoagulante *in vitro*

A atividade anticoagulante foi monitorada através de ensaios específicos que são indicativos para a formação do coágulo sanguíneo. Os testes de Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPA) e Tempo de Protrombina (TP) foram realizados em triplicata. O tempo de coagulação sanguínea para o teste do TTPA após adição do PSGc nas concentrações de 0,1; 0,5; 1 e 2 mg/mL foram de 1,36 ($44,9 \pm 1,6$), 1,23 ($40,8 \pm 0,5$), 1,09 ($36,1 \pm 0,4$ s), e 1,23 ($40,5 \pm 0,4$ s), respectivamente. Diante dos resultados, os PSGc prolongaram o tempo de coagulação sanguínea em no máximo 1,36 vezes, na concentração de 0,1 mg/mL, em relação ao plasma controle ($33,0 \pm 0,05$ s) (Tabela 3), confirmando um baixo efeito do PSGc sobre o sistema intrínseco da cascata de coagulação. O PSGc não apresentou efeito sobre o teste de TP, mostrando que os PSGc não apresentaram ação sobre o sistema extrínseco da cascata de coagulação. Foi avaliado que o potencial anticoagulante obtido para o PSGc foi inferior quando comparado aos polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gelidiella acerosa* (PSGa), visto que os PSGa foram capazes de prolongar o tempo de coagulação em mais de 2x na concentração de 1 mg/mL, no teste de TTPA (CHAGAS *et al.*, 2020).

Tabela 3: Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria cuneata* avaliada pelo teste do TTPA.

Polissacarídeos	Concentração (mg/mL)	TTPA (s)	T ₁ /T ₀ ^a
PSGc	0,10	44,9 ± 1,6	1,36
	0,50	40,8 ± 0,5	1,23
	1,00	36,1 ± 0,4	1,09
	2,00	40,5 ± 0,4	1,23
	Concentração (µg/mL)	TTPA (s)	T ₁ /T ₀ ^a
	0,10	50,0 ± 13,0	1,47

	0,50	80,0 ± 11,6*	2,36
Heparina 156 UI	1,00	141,3 ± 7,1*	4,16
	2,00	>300*	-

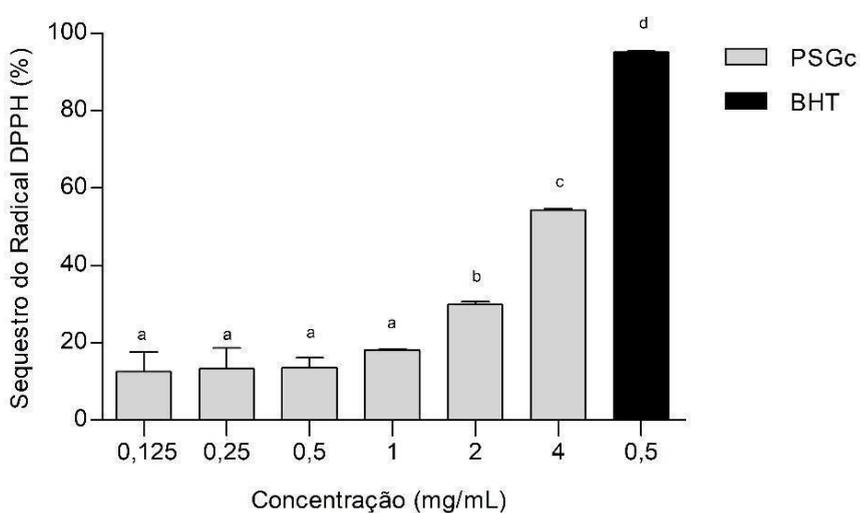
Fonte: elaborada pelo autor

4.7 Avaliação do potencial antioxidante *in vitro*

4.7.1 Sequestro do radical 2,2 – difenil-hidrazilo-hidrato (DPPH)

Os PSGc foram avaliados nas concentrações entre 0,125 – 4 mg/mL. O PSGc apresentou efeito maior na concentração de 4 mg/mL, com taxa de eliminação de 54,3 %. Em contrapartida, o controle (BHT) apresentou 95,68 % de capacidade de eliminação do radical DPPH, de acordo com a figura 07.

Figura 07: Efeito dos PSGc no sequestro do radical DPPH.



Fonte: elaborada pelo autor.

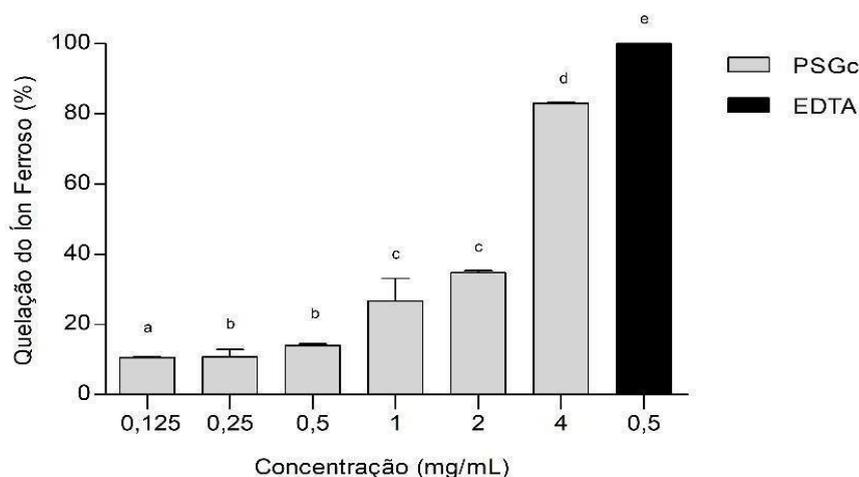
Os PSGc apresentaram maior efeito na concentração 4 mg/mL, com eliminação de 54,3 % dos radicais DPPH, resultado superior ao que foi observado para

os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* (CHAGAS *et al.*, 2020) que apresentou efeito antioxidante de 41,74 % contra radicais DPPH na maior concentração testada.

4.7.2 Ensaio quelação do íon ferroso.

Os PSGc apresentaram potencial de quelação 83,05% na maior concentração (4 mg/mL). Já o controle etilenodiaminotetracético (EDTA) apresentou 99,61 % de quelação do íon ferroso, de acordo com a figura 08.

Figura 08: Atividade dos PSGc na quelação do íon ferroso.

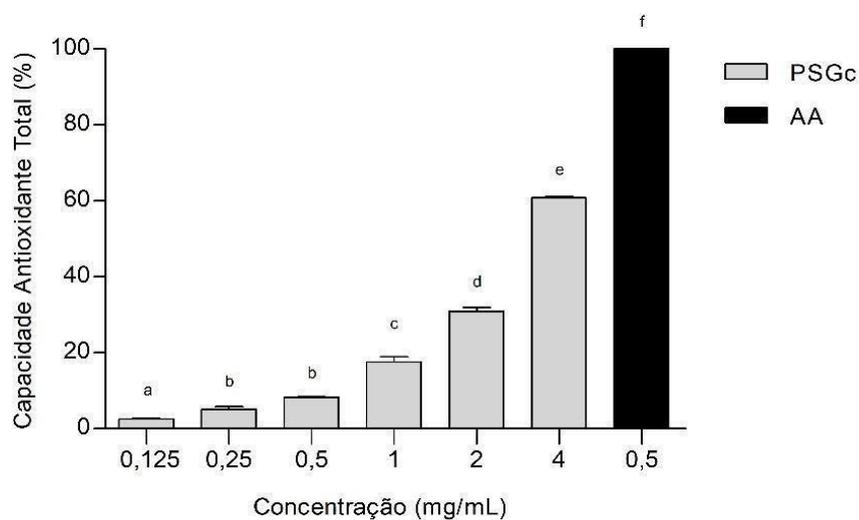


Fonte: elaborado pelo autor.

O efeito observado no teste de QIF foi de 83,05 % na maior concentração testada (4 mg/mL), que foi superior ao observado para os polissacarídeos sulfatados da *Gracilaria caudata* (ALENCAR *et al.*, 2019) que na mesma concentração (4 mg/mL), apresentou efeito quelante de 69,8 %.

4.7.3 Capacidade antioxidante total

O PSGc apresentou atividade antioxidante total de 60,80 % na maior concentração (4 mg/mL). Em contrapartida, o ácido ascórbico apresentou 100 % de atividade antioxidante total de acordo com a figura 09.

Figura 09: Capacidade antioxidante total dos PSGc

Fonte: elaborado pelo autor.

Os PSGc apresentaram atividade antioxidante total de 60,80 % na maior concentração testada (4 mg/mL). Esse resultado é similar ao obtido para a alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (SOUSA *et al.*, 2015), que apresentou capacidade antioxidante total de 62,4% na concentração de 4 mg/mL.

5. CONCLUSÃO

O método de extração enzimática utilizado para a obtenção dos polissacarídeos sulfatados se mostrou bastante eficaz na digestão de proteínas. As análises químicas mostraram presença de 89,5% de açúcares totais e baixa contaminação protéica.

Através do MEV, foi possível determinar e quantificar os elementos químicos presentes na amostra, como carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre. Outrossim, através do MEV foi possível verificar a estrutura morfológica dos PSGc, revelando que eles possuem morfologia laminada, cadeias ramificadas e a topografia lisa.

Os PSGc não apresentaram efeito significativo sob a coagulação sanguínea, porém apresentaram atividade antioxidante satisfatória. Diante dos resultados, os PSGc surgem como alternativa, necessitando de mais estudos para investigar o potencial desses polímeros e seus mecanismos de ação sobre o sistema antioxidante. Sendo assim, abre-se uma nova perspectiva para a investigação desse material como alternativa futura para a indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

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.; Lima, G. C.; Barros, F. C. N.; Costa, L. E.; Ribeiro, C. V. P.; Sousa, W. M.; Freitas, A. L. P. 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.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, **Official Method** 981.10. 18 ed. Gaithersburg: 2010.

ARATA, P.X.; Quintana, I.; Canelón, D.J.; Vera, B.E.; Compagnone, R.S.; Ciancia, M. Chemical structure and anticoagulant activity of highly pyruvylated sulfated galactans from tropical green 31 seaweeds of the order Bryopsidales. **Carbohydr. Polym.** 2015, 122, 376-86; DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.10.030.

ARIFFIN, S. H.; YEEN, W. W.; ABIDIN, I. Z.; ABDUL-WAHAB, R. M.; ARIFFIN, Z. Z.; SENAFI, S. Cytotoxicity effect of degraded and undegraded kappa and iota carrageenan in human intestine and liver cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2014.

BANU, V. Shajeeda; MISHRA, Jayant Kumar. Fatty acid, micronutrient, proximate composition and phytochemical analysis of red seaweed *Tricleocarpa fragilis* (L.) Huisman & RA Towns from Andaman Sea, India. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 2143-2148, 2018.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. [s.l.]. v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde, **Rede Interagencial de Informação para a Saúde**, DataSUS. População Residente: notas técnicas. DATASUS; 2019; Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibge/popdescr.htm>.

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

CARNEIRO, José Gerardo et al. Potencial nutricional das algas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Solieria filiformis*: Análises da composição centesimal. In: **VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012

CHAGAS, F. D. DA S.; LIMA, G. C.; DOS SANTOS, V. I. N.; COSTA, L. E. C.; DE SOUSA, W. M.; SOMBRA, V. G.; DE ARAÚJO, D. F.; BARROS, F.C.N.; MARINHO-SORIANO, E.; DE ANDRADE FEITOSA, J.P.; DE PAULA, R. C. M.; PEREIRA, M. G.; FREITAS, A. L. P. Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**. [s.l.]. v. 159, p. 415–421, 2020.

CECCHI, Heloísa Máscia. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora da UNICAMP, 2003.

CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT-Food Science and Technology**. [s.l.]. v. 41, n. 6, p. 1067-1072, 2008.

COSTA, Luis Eduardo C. et al. Chemical structure, anti-inflammatory and antinociceptive activities of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria intermedia* algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 966-975, 2020.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**. [s.l.]. v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FLEURENCE, Joël et al. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?. **Trends in food science & technology**, v. 27, n. 1, p. 57-61, 2012.

FRANCESCHINI, Iara Maria et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed Editora, 2009.

Graham, L.E., Graham, J.M. & Wilcox, L.W. 2009. **Algae**. 2 ed. Pearson, San Francisco.

KHAN, Bilal Muhammad et al. Physicochemical characterization and antioxidant activity of sulphated polysaccharides derived from *Porphyra haitanensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 145, p. 1155-1161, 2020.

MANLUSOC, Joanne Katherine Talens et al. Pharmacologic application potentials of sulfated polysaccharide from marine algae. **Polymers**, v. 11, n. 7, p. 1163, 2019.

- MEYER, B. N., N. R. FERRIGNI, J. E. PUTNAM, L. B. JACOBSEN, D. E. NICHOLS, AND J. L. MCLAUGHLIN. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituent **Planta Medicina**. [s.l.]. v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.
- MOURÃO, Paulo AS et al. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm: sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23973-23984, 1996..
- NAGAKURA, K. General analysis. In: OKADA, M, et al. (Ed.). **Utilization of Marine Products**. Tokyo: Overseas Technical Cooperation Agency. p. 159-169, 1972
- PEREZ-RECALDE, M.; CANELÓN, D. J.; COMPAGNONE, R. S.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S.; CIANCIA, M. Carrageenan and agar structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*. **Carbohydrate Polymers**. [s.l.]. v.136 1370-1378, 2016.
- PRIETO, Pilar; PINEDA, Manuel; AGUILAR, Miguel. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- RITCHIE, R. H.; DRUMMOND, G. R.; SOBEY, C. G.; DE SILVA, T. M.; KEMP-HARPER, B. K. The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease. **Pharmacological research**, v.116, p. 57-69, 2017.
- SHINDE, Pravin; BANERJEE, Paromita; MANDHARE, Anita. Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015–2018). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 29, n. 4, p. 283-309, 2019.
- SOUSA, Willer M. et al. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate polymers**, v. 152, p. 140-148, 2016.
- TABARSA, Mehdi et al. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 12, p. 2500-2506, 2012.
- TANG, L.; CHEN, Y.; JIANG, Z.; ZHONG, S.; CHEN, W.; ZHENG, F.; SHI, G. Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia livida*. **International journal of biological macromolecules**, v. 94, p. 642-652, 2017.
- TANNA, B; MISHRA, A. Nutraceutical Potential of Seaweed Polysaccharides: Structure, Bioactivity, Safety, and Toxicity. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s.l.]. v. 18, n. 3, p. 817-831, 2019.

VAIKUNDAMOORTHY, Ramalingam et al. Structural characterization and anticancer activity (MCF7 and MDA-MB-231) of polysaccharides fractionated from brown seaweed *Sargassum wightii*. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 1229-1237, 2018.

VASCONCELOS, A.A.; Pomin, V.H. Marine Carbohydrate-Based Compounds with Medicinal Properties. **Mar Drugs** 2018; 16, pii: E233. doi: 10.3390/md16070233.

WOLBERG, A. S.; ALEMAN, M. M.; LEIDERMAN, K.; MACHLUS, K. R. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: **Virchow, 2019, triad revisited**. Anesthesia and analgesia. 2015.