



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

FRANCISCO DIEGO DA SILVA CHAGAS

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA
ALGA MARINHA *Bryothamnion seaforthii*: EFEITO ANTIOXIDANTE E
TOXICIDADE**

FORTALEZA

2022

FRANCISCO DIEGO DA SILVA CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA ALGA
MARINHA *Bryothamnion seaforthii*: EFEITO ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

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

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

C424c Chagas, Francisco Diego da Silva.
Caracterização estrutural do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Bryothamnion seaforthii*: efeito antioxidante e toxicidade / Francisco Diego da Silva Chagas. – 2022.
57 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. Galactana. 2. Antioxidante. 3. Atóxico. I. Título.

CDD 572

FRANCISCO DIEGO DA SILVA CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA ALGA
MARINHA *Bryothamnion seaforthii*: EFEITO ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 19/09/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Norma Maria Barros Benevides
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Renan Oliveira Silva Damasceno
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Glauber Cruz Lima
Centro Universitário INTA (UNINTA)

Prof^a. Dr^a. Renata Line da Conceição Rivanor
Centro Universitário INTA (UNINTA)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, por toda saúde e força que me foi concebida nos momentos mais difíceis e delicados.

À minha mãe, **Iracir Braz**, por estar sempre ao meu lado durante toda a minha vida. Eu devo a essa mulher fantástica todas as minhas conquistas, pois sem sua determinação e garra, eu não estaria aqui. Você é uma pessoa guerreira e tenho muito orgulho de ter como mãe uma mulher tão forte.

Aos meus queridos irmãos, **Jorge Braz** e **Junior Chagas**, vocês são maravilhosos e sempre me deram força para seguir em frente.

À minha orientadora, Prof.^a **Ana Lúcia Ponte Freitas**, por todos os momentos compartilhados e por ser essa pessoa íntegra, generosa e bondosa. Com você o ambiente de trabalho torna-se um espaço leve, deixando sempre a rotina no laboratório tranquila e prazerosa. O seu espírito fraternal de orientadora, irei levar para o resto da vida.

Ao Prof. **Renan Damasceno** por toda a contribuição e colaboração com a avaliação da toxicidade e pelas contribuições oferecidas como membro da banca.

Ao Laboratório de Polímeros da UFC, em especial, prof.^a **Regina de Paula**, pela disponibilidade de colaboração, e ao **Venícios Sombra** e **Lais Monteiro**, pelo auxílio na realização da caracterização química.

Aos outros membros da banca e suplentes, **Ayrles Brandão**, **Glauber Cruz**, **Norma Benevides**, **Renata Line Rivanor** e **Bartolomeu Souza**, por todas as contribuições e pela disponibilidade no aceite e participação nesse momento marcante da minha vida acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Algas Marinhas, **Poliana Cavalcante**, **Ana Paula Cavalcante** e **Gabriel Candido**, por todos os momentos compartilhados. Toda essa jornada foi facilitada pelo simples fato de ter vocês ao meu lado. Além disso, é importante ressaltar toda ajuda oferecida para o desenvolvimento desse trabalho. Com vocês, até os momentos de dificuldade foram bem mais leves.

Ao **Luan Bernardes**, por todo carinho e atenção. Você nunca me deixou desanimar e sempre mostrou que o melhor estava por vir.

À **Cristiane Nogueira**, por todos os momentos de descontração. Você é uma pessoa incrível que tive a oportunidade de compartilhar boa parte da minha vida e da minha caminhada acadêmica.

À **Amanda Fernandes**, pela ajuda nos momentos de aflição com sua calma e sabedoria. Além disso, sempre me escutou, ajudou ao longo do doutorado e foi plateia para minhas apresentações, sempre solícita e empolgada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.” (DARWIN, 1871, p.3).

RESUMO

O estresse oxidativo é uma condição bioquímica de desequilíbrio que pode culminar na degradação de estruturas celulares e proporcionar o desencadeamento de inúmeras patologias. Nessa perspectiva, os carboidratos de algas marinhas se apresentam como macromoléculas alternativas capazes de combater o estresse oxidativo, devido ao potencial antioxidante já descrito na literatura. Diante disso, o estudo objetivou isolar, caracterizar e avaliar toxicidade e a atividade antioxidante do polissacarídeo sulfatado de *Bryothamnion seaforthii*. A alga marinha vermelha *B. seaforthii* foi coletada na Praia de Guajiru (Trairi, Ceará) e submetida à análise de composição centesimal. Após o primeiro passo, foi obtido, por digestão enzimática, o polissacarídeo sulfatado de *Bryothamnion seaforthii* (PS-Bs), que foi submetido à caracterização química através de análises colorimétricas, microanálise elementar, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), Espectrometria por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A toxicidade de PS-Bs foi avaliada contra náuplios de *Artemia* sp. e em camundongos BALB/c e seu efeito antioxidante contra diferentes radicais foi investigado. A macroalga *B. seaforthii* revelou alto teor de carboidratos ($75,05 \pm 0,21\%$) e o PS-Bs exibiu 91,4% de carboidratos totais e apenas traços de contaminantes proteicos ($<1\%$). Ademais, apresentou morfologia laminada com cadeias ramificadas curtas verificadas através do MEV. As técnicas de GPC e microanálise elementar revelaram que PS-Bs apresenta uma massa molar média de 74,4 kDa e um grau de sulfatação de 0,67, respectivamente. Além disso, FT-IR e RMN confirmaram que PS-Bs é uma galactana do tipo agarana. PS-Bs não apresentou efeito tóxico em nenhum dos testes e não promoveu alterações significativas nos parâmetros clínicos, bioquímicos e histológicos em camundongos. PS-Bs exibiu efeito antioxidante dependente da concentração no teste que investiga a capacidade antioxidante total (2,48-98,64%), quelação do íon ferroso (5,73-54,05%) e sequestro do radical hidroxila (13,79-72,27%). Esses resultados sugerem que PS-Bs é um antioxidante natural promissor e que não apresenta efeitos tóxicos.

Palavras-chave: galactana; antioxidante; atóxico.

ABSTRACT

Oxidative stress is a biochemical condition of imbalance that can culminate in the degradation of cellular structures and trigger numerous pathologies. From this perspective, marine algae carbohydrates are presented as alternative macromolecules capable of combating oxidative stress, due to the antioxidant potential already described in the literature. Therefore, the study aimed to isolate, characterize and evaluate the toxicity and antioxidant activity of the sulfated polysaccharide from *Bryothamnion seaforthii*. The red seaweed *B. seaforthii* was collected at Praia de Guajiru (Trairi, Ceará) and subjected to proximate composition analysis. After the first step, the sulfated polysaccharide from *Bryothamnion seaforthii* (PS-Bs) was obtained by enzymatic digestion, which was subjected to chemical characterization through colorimetric analysis, elemental microanalysis, Scanning Electron Microscopy (SEM), Permeation Chromatography in Gel (GPC), Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The toxicity of PS-Bs was evaluated against *Artemia* sp. and in BALB/c mice and its antioxidant effect against different radicals was investigated. The macroalgae *B. seaforthii* showed high carbohydrate content ($75.05 \pm 0.21\%$) and PS-Bs showed 91.4% of total carbohydrates and only traces of protein contaminants ($<1\%$). Furthermore, it presented laminated morphology with short branched chains verified by SEM. GPC and elemental microanalysis revealed that PS-Bs has an average molar mass of 74.4 kDa and a degree of sulfation of 0.67, respectively. Furthermore, FT-IR and NMR confirmed that PS-Bs is an agaran-like galactan. PS-Bs showed no toxic effect in any of the tests and did not promote significant changes in clinical, biochemical and histological parameters in mice. PS-Bs exhibited a concentration-dependent antioxidant effect in the test that investigates total antioxidant capacity (2.48-98.64%), ferrous ion chelation (5.73-54.05%) and hydroxyl radical scavenging (13, 79-72.27%). These results suggest that PS-Bs are a promising natural antioxidant that has no toxic effects.

Keywords: galactan; antioxidant; non-toxic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Origens endógenas e exógenas das EROs e ERNs.....	13
Figura 2– Aspecto macroscópico de <i>Bryothamnion seaforthii</i> e classificação taxonômica.....	16
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura química das galactanas	18
Figura 4 – Estrutura das galactanas sulfatadas de algas vermelhas.....	19
Figura 5 – Principais efeitos biológicos das galactanas sulfatadas	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
NDGA	Ácido nordihidroguaiarético
OG	Octil galato
PG	Propil galato
PS-Bs	Polissacarídeo Sulfatado de <i>Bryothamnion seaforthii</i>
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Estresse oxidativo e saúde humana	13
2.2	Visão geral sobre antioxidantes sintéticos e antioxidantes naturais	14
2.3	Algas marinhas vermelhas	15
2.4	Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas	17
2.5	Investigação da toxicidade de polissacarídeos de rodofíceas	19
2.6	Propriedades farmacológicas dos polissacarídeos sulfatados de rodofíceas	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	Geral	22
3.2	Específicos	22
4	PERMISSÃO LEGAL	23
	REFERÊNCIAS	24
	APÊNDICE A – SULFATED POLYSACCHARIDE FROM THE SEAWEED <i>Bryothamnion seaforthii</i>: TOXICOLOGICAL AND ANTIOXIDANT EFFECT	29

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço da ciência e as descobertas das últimas décadas, várias doenças têm sido relacionadas aos danos resultantes do estresse oxidativo sobre o organismo. Por conseguinte, é estabelecido que o estresse oxidativo possui relação direta com a etiologia de inúmeras patologias, como síndrome metabólica, aterosclerose, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, doenças renais, doenças gastrointestinais, obesidade e câncer (VONA *et al.*, 2021; HAJAM *et al.*, 2022).

No intuito de prevenir o estresse oxidativo, antioxidantes como vitamina C, vitamina E e N-acetilcisteína são usados regularmente em vários regimes de tratamento (HENKEL, SANDHU, AGARWAL, 2019). Além disso, a indústria cosmética e alimentícia utiliza diferentes tipos de antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (GULCIN, 2020). No entanto, estudos têm mostrado que tais substâncias sintéticas apresentam uma série de desvantagens e riscos à saúde (MAJUMDER *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2021; KANAGARAJ *et al.*, 2022). O BHA é capaz de induzir deformidades em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*), afetar a fertilidade e interromper o crescimento desses organismos (KANAGARAJ *et al.*, 2022). Ademais, o NDGA (ácido nordihidroguaiarético), um antioxidante alimentar, foi identificado como a causa raiz da doença cística renal em roedores (NEHA *et al.*, 2019).

Diante do exposto, a demanda por antioxidantes naturais como alternativa aos antioxidantes sintéticos tem aumentado nos últimos anos (COULOMBIER, JAUFFRAIS, LEBOUVIER, 2021). Nessa perspectiva, moléculas obtidas de algas marinhas surgem como alternativa devido à grande disponibilidade, fácil acesso e sua natureza ecossustentável (KALASARIYA *et al.*, 2021). Nesse contexto, há vários relatos quanto ao efeito dos polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas sobre o sistema antioxidante (SOUSA *et al.*, 2016; ALENCAR *et al.*, 2019; KANG *et al.*, 2022).

A alga marinha vermelha *Bryothamnion seaforthii* é comumente encontrada na costa do nordeste brasileiro. Ademais, relatos anteriores destacam que carboidratos sulfatados presentes nas frações de lectinas e carboidratos isoladas de *B. seaforthii* apresentaram efeitos antinociceptivos (VIANA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004). Outrossim, lectinas isoladas desta alga mostraram efeitos anti-hiperglicêmicos e antioxidantes em ratos. Nesse estudo, o efeito antioxidante foi evidenciado através da redução de radicais livres (ALENCAR ALVES *et al.*, 2020).

Embora amplamente reconhecidos como benéficos para a saúde humana, os antioxidantes podem apresentar efeitos pró-oxidantes e/ou tóxicos após reação com diferentes

espécies de radicais livres (DOSSENA, MARINHO, 2021). Destarte, novas moléculas que se destinam à utilização humana necessitam de uma avaliação em relação à segurança de uso (JONG, GEERTSMA, BORCHARD, 2022). Considerando essa problemática, a avaliação da toxicidade de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é essencial, apesar de sua difundida aplicação na indústria cosmética e alimentícia (GUAN, LI, MAO, 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estresse oxidativo e saúde humana

No organismo, quando ocorre desequilíbrio bioquímico entre o sistema oxidante e antioxidante em favor dos agentes oxidantes, surgem condições que caracterizam o “estresse oxidativo” (DEMIRCI-ÇEKIC *et al.*, 2022). No geral, esse termo é utilizado para definir um estado característico representado por altos níveis de agentes oxidantes, como Espécies Reativas de Oxigênio e Espécies Reativas de Nitrogênio, EROs e ERNs, respectivamente. Além disso, o estresse oxidativo é caracterizado por um nível diminuto de antioxidantes, que pode culminar em danos à maquinaria celular (SINGH, KUKRETI, SASO, KUKRETI, 2022).

O dano celular é desencadeado frequentemente por EROs e ERNs, que podem ser de origem exógena ou endógena (Figura 1) (BAKADIA *et al.*, 2021). As EROs incluem principalmente ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso e as ERNs incluem majoritariamente óxido nítrico, dióxido de nitrogênio e peroxinitrito (HALLIWELL, 2007; DEMIRCI-ÇEKIC *et al.*, 2022).

Figura 1 - Origens endógenas e exógenas das EROs e ERNs. No caso dos compostos exógenos que penetram no corpo, eles são degradados ou metabolizados, culminando na geração de EROs e ERNs como subprodutos danosos que agem sobre o organismo.



Fonte: o autor.

Em situações de estresse oxidativo, as espécies reativas podem causar danos as diversas biomoléculas do organismo, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (SIES, 2020). Nesse processo de degradação celular, uma das organelas que mais sofre com a ação danosa desses radicais é a mitocôndria, devido ao processo de respiração celular e geração de radicais livres (LUO *et al.*, 2020). Um marcador chave do estresse oxidativo é o dano ao DNA, através promoção de danos as bases nitrogenadas, purinas e pirimidinas oxidadas e quebras de DNA (IONESCU-TUCKER, COTMAN, 2021). De modo geral, o estresse oxidativo é associado com frequência a uma série de doenças, devido aos danos que os radicais livres podem causar as células (CALIRI, TOMMASI, BESARATINIA, 2021; DEMIRCI-ÇEKIC *et al.*, 2022).

Nessa perspectiva, é emergente a busca por antioxidantes naturais capazes de temporizar a ação desses radicais sobre o organismo. No geral, as espécies reativas são subprodutos metabólicos necessários para a função fisiológica, mas podem ser tóxicos em altos níveis (IONESCU-TUCKER, COTMAN, 2021). Logo, é fundamental a utilização de agentes antioxidantes naturais, visando regular os fatores danosos e buscar o equilíbrio e a homeostase celular (SANCHEZ-MORATE *et al.*, 2020).

2.2 Visão geral sobre antioxidantes sintéticos e antioxidantes naturais

Halliwell e Gutteridge (2015) definem antioxidante como qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo frente a molécula alvo. Os antioxidantes sintéticos são largamente utilizados na indústria, principalmente por apresentarem grande estabilidade, desempenho considerável e baixo custo (LOURENÇO, MOLDÃO-MARTINS, ALVES, 2019). Dentre os antioxidantes sintéticos empregados pela indústria, os mais populares são hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) terc-butil-hidroquinona (TBHQ), propil galato (PG) e octil galato (OG) (GULCIN, 2020).

Apesar da ampla utilização, os antioxidantes sintéticos têm sido apontados como drogas que apresentam segurança questionável devido aos aspectos toxicológicos (DOSSENA, MARINHO, 2021). Existem vários estudos indicando uma relação entre a ingestão a longo prazo de antioxidantes sintéticos e alguns problemas de saúde, como o risco de desenvolver câncer (MAJUMDER *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2021). Ademais, altas doses de antioxidantes sintéticos podem causar danos ao DNA. De modo complementar, há forte correlação entre a utilização de BHA, BHT e TBHQ e o processo de citotoxicidade e tumorigênese (XU *et al.*, 2021).

Nesse contexto, há uma tendência hodierna em substituir os antioxidantes sintéticos

por antioxidantes obtidos de fontes naturais (SHAH, MIR, 2022). Além disso, esse processo de substituição é estimulado pela mudança de postura da população, que busca produtos cada vez mais naturais e livres de conservantes sintéticos. Por conta disso, é crescente a preferência pelos produtos que empregam compostos naturais em sua composição (MIRZANAJAFI-ZANJANI, YOUSEFI, EHSANI, 2019).

Diante da mudança de postura da população e com os avanços da biotecnologia, estudos revelam que moléculas oriundas de plantas e macroalgas marinhas apresentam efeitos antioxidantes promissores (HERMUND *et al.*, 2015). Nesse contexto, existe uma grande necessidade de pesquisas para explorar novas moléculas antioxidantes de algas marinhas. Há estudos avançados que citam uma série de aplicações biomédicas de moléculas desses organismos como antioxidantes naturais (AROKIARAJAN *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, algas marinhas surgem como alternativa promissora devido à elevada disponibilidade na natureza (CHUDASAMA, 2021). Compostos de macroalgas podem apresentar ação antioxidante direta na eliminação de EROs, com consequente desempenho satisfatório no combate ao estresse oxidativo ou através da otimização dos sistemas antioxidantes endógenos de animais e humanos (LIU, SUN, 2020). Diante disso, as macroalgas marinhas vermelhas tem sido cada vez mais estudadas (ALENCAR *et al.*, 2019; CHAGAS *et al.*, 2020).

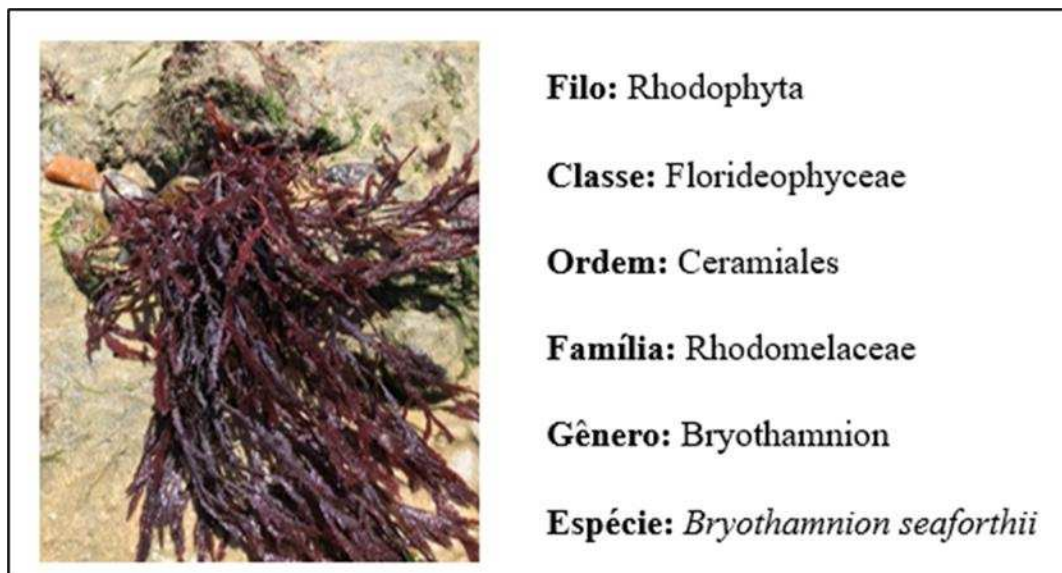
2.3 Algas marinhas vermelhas

As algas vermelhas integram o grande agrupamento de algas eucarióticas mais antigas presentes no ambiente aquático. Essas macroalgas compõem o grupo taxonômico mais diversificado, com aproximadamente 6.500 espécies identificadas (NAN *et al.*, 2017). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) em 2019, a produção mundial de cultivo de algas atingiu o patamar de 34,7 milhões de toneladas, que equivale a cerca de US\$ 14,7 bilhões. Desse valor total, mais da metade (52,6%), valor superior a US\$ 7 bilhões, são oriundos do grande grupo das algas vermelhas, pertencentes ao filo Rhodophyta (CAI *et al.*, 2021).

Ao longo da história da humanidade e especialmente no continente asiático, as algas marinhas vermelhas têm sido usadas para diferentes finalidades, dentre as quais podemos destacar sua utilização como matéria-prima, ingrediente, suplemento alimentar e ração (QIU *et al.*, 2022). Diante da grande diversidade algal, merecem destaque as rodófitas, constituindo o grupo com o maior número de espécies no nordeste do Brasil e na costa brasileira (CAVALCANTI, SÁNCHEZ, FUJII, 2022).

O filo Rhodophyta comporta o gênero *Bryothamnion* que inclui 12 espécies de algas, amplamente distribuídas nos mares ocidentais (GUIRY; GUIRY, 2019). Nesse gênero, a espécie *Bryothamnion seaforthii* apresenta larga distribuição ao longo da costa cearense (DE MORAES *et al.*, 2000). A alga marinha *B. seaforthii* apresenta coloração vermelha intensa e encontra-se disposta em tufos fixados aos corais nas zonas intermarés e em profundidades de 5 a 20 metros (Figura 2). Em relação as suas características morfológicas, apresenta estrutura membranosa com aproximadamente 25 cm de altura, talo achatado e eixos principais semicilíndricos. Além disso, a espécie apresenta grande número de ramos curtos espinescentes, disticamente organizadas e alternantes (MORAIS, 2000).

Figura 2 - Aspecto macroscópico de *Bryothamnion seaforthii* e classificação taxonômica.



Fonte: o autor.

Em relação a investigação dos efeitos biológicos, existem alguns estudos com moléculas isoladas dessa agarófita, que confirmam a presença de carboidratos e lectinas com efeito antinociceptivo (VIANA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004). Ademais, uma lectina isolada de *B. seaforthii* foi capaz de estimular a reestruturação de feridas cutâneas devido ao seu efeito pró-cicatrizante (DO NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012). Além disso, estudos recentes demonstraram que essa espécie apresenta efeitos anti-hiperglicêmicos e antioxidantes em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (ALENCAR ALVES *et al.*, 2020).

Atualmente, há uma tendência de aumento em relação ao consumo de algas vermelhas em outros continentes além da Ásia, possivelmente devido ao aspecto atrativo ao paladar e pelos diferentes benefícios à saúde (QIU *et al.*, 2022). Além da crescente demanda global por algas vermelhas como alimentos funcionais, os carboidratos de algas marinhas

vermelhas têm atraído considerável atenção dos pesquisadores do mundo todo, pois possuem polissacarídeos com características particulares (KRYLOVA et al., 2022).

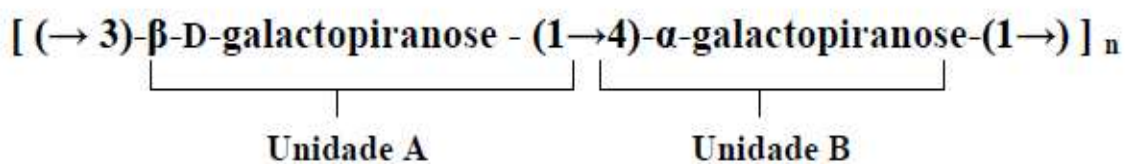
2.3 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas

As macroalgas vermelhas contêm grandes quantidades de polissacarídeos sulfatados, localizados principalmente no interior da matriz da parede celular. Esses polímeros possuem características estruturais e propriedades biológicas únicas, que os tornam matéria-prima de vários produtos e estimulam diferentes estudos. Dessa forma, é importante entender suas propriedades estruturais para explorar seus benefícios à saúde (QIU et al., 2022).

De modo geral, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas podem ser descritos como polímeros de carboidratos complexos, polianiônicos e heterogêneos formados por unidades repetitivas de açúcares e carregados negativamente, devido à presença de grupamentos sulfato ao longo de sua cadeia polimérica (LEE et al., 2017).

Quanto ao padrão químico, essas macromoléculas são constituídas principalmente por unidades de galactose e por conta disso, são denominadas de galactanas (ALENCAR et al., 2019). São formadas por unidades repetitivas e alternadas de β (1 \rightarrow 3) D- galactopiranosose (unidade A) e α (1 \rightarrow 4) D- ou L- galactopiranosose (unidade B), onde ambas as unidades, A e B, se alternam (AB)_n e podem ser sulfatadas (Figura 3) (PAINTER, 1983; BILAL, IQBAL, 2019).

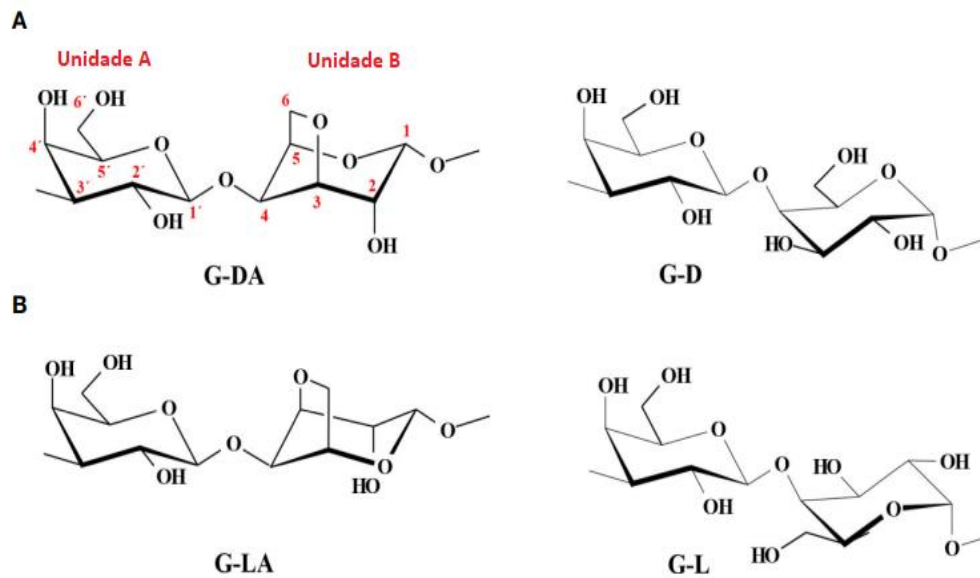
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura química das galactanas.



Fonte: Barros et al., (2013).

Quanto à caracterização estrutural, as galactanas 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 (Figura 4). Além disso, pesquisas recentes relatam a existência de galactanas híbridas de carboidratos tipo ágar e carragenana. Dessa forma, o polímero pode ser mais rico em agaranas ou em carragenanas (SÁNCHEZ, MATULEWICZ, CIANCIA, 2021).

Figura 4 – Estrutura das galactanas sulfatados de algas vermelhas. (A) Estruturas principais das carragenanas, (B) Estruturas principais das agaranas.



Fonte: Ciancia, Matulewicz, Tuvikene (2020, com modificações).

O termo ágar ou agarana é usado para descrever uma gama de polissacarídeos constituídos de enantiômeros D- e L- de galactose. De modo geral, as agaranas consistem da mistura de uma fração neutra, chamada de agarose e de uma fração aniônica, que corresponde às agaropectinas (ZHANG *et al.*, 2019)

A agarose corresponde a uma estrutura molecular linear, que não apresenta grupamento sulfato na sua composição química. Essas moléculas são formadas por unidades alternadas β -1,3 D-galactose e α -1,4 3,6-anidro-L-galactose. Além disso, esse polímero pode apresentar substituições de seus resíduos de monossacarídeos por 6-O- metil-D-galactose, L-galactose e 2-O-metil-L-galactose (ARMISEN; GALACTAS, 1987; PHILLIPS; WILLIAMS, 2009).

A porção formada por agaropectina apresenta diferentes grupamentos químicos, como ácido pirúvico, ácido D-glucurônico, metil e/ou sulfato, que estão associados a uma estrutura linear da agarose, localizados em diferentes combinações ou posições na molécula, garantindo a diversidade estrutural das galactanas sulfatadas (ARMISEN; GALACTAS, 1987; SÁNCHEZ *et al.*, 2021).

É importante ressaltar que o fato de ser de origem natural não garante a segurança de consumo de polissacarídeos sulfatados. Diante disso, são necessários estudos quanto à avaliação da toxicidade desses polímeros para definir as condições de sua empregabilidade pela indústria. Logo, é emergente a necessidade de pesquisas para avaliar a toxicidade de

polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, seja para uso como alimento, aditivo, nutracêutico ou conservante (TANNA, MISHRA, 2019).

2.4 Investigação da toxicidade de polissacarídeos de rodofíceas

A maioria dos levantamentos evidenciam a ausência de toxicidade e a segurança de consumo de algas marinhas (BANACH *et al.*, 2020). Um estudo realizado no continente asiático estabeleceu correlação entre fatores de risco para o câncer e o consumo de algas marinhas coreanas. A investigação mostrou que o consumo da alga vermelha do gênero *Porphyra* está associado à diminuição do risco de câncer de mama em mulheres coreanas (YANG *et al.*, 2010).

Estudos têm sido realizados para avaliar a segurança de uso e a toxicidade de biomoléculas identificadas de algas marinhas, visando sua utilização pela indústria. Dessa forma, foi evidenciando que algumas moléculas obtidas de algas marinhas eram tóxicas para os seres humanos, embora também apresentassem uma série de efeitos benéficos (KUMAR, SHARMA, 2021).

Frente ao atual cenário científico, carboidratos de algas marinhas recebem destaque em pesquisas devido à ausência de toxicidade e por serem viáveis do ponto de vista econômico (MUTHUKUMAR, CHIDAMBARAM, SUKUMARAN, 2021). No entanto, apesar de pouco frequente, um estudo farmacodinâmico com administração da galactana sulfatada do tipo carragenina em animais por maiores períodos, resultou em colite ulcerosa e danos na membrana da mucosa intestinal. Além disso, como resultado da administração, podem ocorrer neoplasias em razão da resposta inflamatória provocada pelo polímero (GUAN, LI, MAO, 2017).

Apesar das questões levantadas acima, outros estudos de investigação da toxicidade mostraram que a ingestão de carragenina como espessante e estabilizante em alimentos não apresentou nenhum efeito colateral importante e nenhuma resposta toxicológica foi induzida. Nesse caso, concluiu-se que não foram causados eventos de carcinogenicidade, genotoxicidade ou defeitos reprodutivos (WEINER, 2014).

Em diversos estudos, os polissacarídeos isolados de diferentes tipos de algas vermelhas, incluindo agarófitas e carragenófitas, não exibiram nenhum sinal de toxicidade quando avaliado o efeito dessas galactanas em testes *in vivo* (ARAÚJO *et al.*, 2011; LAJILI *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2022). Normalmente, pesquisas toxicológicas relatam que polissacarídeos são bem tolerados em animais de experimentação (ARAÚJO *et al.*, 2011).

No geral, polissacarídeos sulfatados são hemocompatíveis, atóxicos e apresentam baixo custo de produção em comparação com outros biopolímeros (AMINABHAVI, 2015). Por

conta disso, podem ser utilizados para atender às demandas da área farmacêutica e biomédica (LEANDRO, PEREIRA, GONÇALVES, 2020).

Dessa forma, esses aspectos estimulam os pesquisadores na projeção de entregas eficazes do ponto de vista industrial, com a visão de produtos baseado em polímeros com aplicação em diversos ramos da indústria (MILAL, IQBAL, 2019). Portanto, considerado o atual panorama, é necessário a avaliação da segurança de uso, utilizando como primeiro passo análise da toxicidade dos polissacarídeos sulfatados para prosseguimentos dos estudos objetivando a avaliação clínica (TANNA, MISHRA, 2019).

2.5 Propriedades farmacológicas dos polissacarídeos sulfatados de rodofíceas

As cargas negativas presentes na estrutura dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas são capazes de promover complexas interações eletrostáticas com muitas proteínas do organismo. Por consequência, as interações entre esses polímeros e moléculas endógenas estão intimamente relacionadas aos seus possíveis efeitos terapêuticos. Além disso, características estruturais como padrão de glicosilação, sulfatação, anomericidade e composição monossacarídica são pontos essenciais da estrutura desses polímeros que devem ser considerados e que podem influenciar nos efeitos biológicos desses hidratos de carbono (POMIN, 2012).

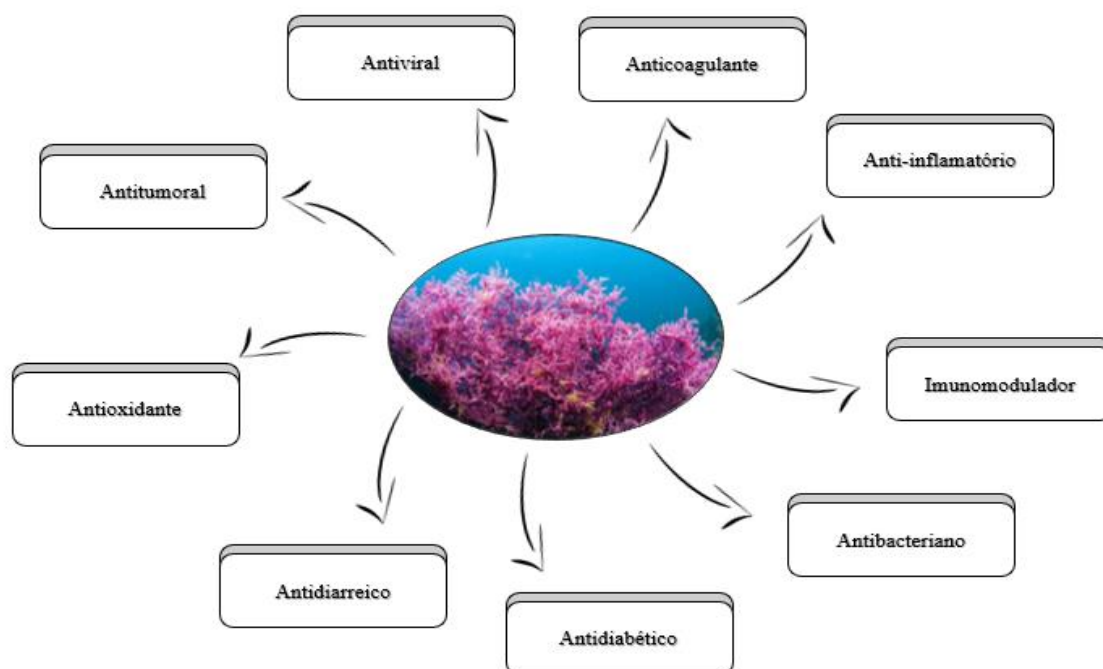
Dentre os vários efeitos fisiológicos dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, podemos destacar os efeitos antitumoral, antiviral, anticoagulante, anti-inflamatório, imunomodulador, antibacteriano, antidiabético, antidiarreico e antioxidante (KANG *et al.*, 2022; QIU *et al.*, 2022). Além disso, estudos realizados na última década confirmam que polissacarídeos são moléculas promissoras quanto à proteção da mucosa gástrica, com forte relação entre o efeito gastroprotetor e a ação antioxidante desses polímeros (SOUSA *et al.*, 2016; LAJILI *et al.*, 2019).

Na pesquisa realizada por Sousa *et al.*, (2016), os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* exibiram efeito gastroprotetor de forma dose-dependente e efeito antioxidante *in vitro* contra diferentes radicais. O efeito gastroprotetor dos polissacarídeos sulfatados de *S. filiformis* foi associado ao considerável potencial antioxidante frente a diferentes tipos de radicais livres, impedindo a ação de EROS.

Uma galactana do tipo agarana obtida da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* apresentou atividade antioxidante *in vitro* através da quelatação de íons ferrosos e redução de íons metálicos. Ademais, os resultados obtidos em ensaios antioxidantes *in vivo* demonstraram que a agarana foi capaz de estimular o sistema endógeno e aumentar a ação de enzimas antioxidantes como a catalase (ALENCAR *et al.*, 2019).

Alguns estudos correlacionam as características químicas de hidratos de carbono de algas marinhas com sua gama de efeitos biológicos descritos na literatura (Figura 4). Como exemplo, podemos destacar o potencial antioxidante dessas macromoléculas, que é atribuído às extremidades redutoras e cargas negativas presente nesses polímeros. Logo, quanto maior o conteúdo de sulfato maior parece ser o efeito antioxidante (KHAN *et al.*, 2019). De forma complementar, é reportado uma relação massa molar e o efeito antioxidante de polissacarídeos, demonstrando que polissacarídeos de menor massa molar são mais promissores, pois apresentam maior probabilidade de apresentar efeito antioxidante (ZHU *et al.*, 2019).

Figura 4 – Principais efeitos biológicos das galactanas sulfatadas.



Fonte: o autor.

Por fim, diante dos mais variados efeitos fisiológicos descritos e das pesquisas que envolvem a caracterização e avaliação da segurança de uso, espera-se avançar nos estudos desses polímeros. Dessa forma, será possível alcançar uma maior aceitação dos polissacarídeos sulfatados, visando novos produtos à base desses polímeros para fortalecer a prospecção tecnológica de produtos naturais a partir das macroalgas (AROKIARAJAN *et al.*, 2022).

3 OBJETIVO

3.1 Geral

O presente trabalho objetivou isolar, caracterizar a estrutura química, avaliar a toxicidade e a atividade antioxidante do polissacarídeo sulfatado de *Bryothamnion seaforthii* (PS-Bs).

3.2 Específicos

- Determinar a composição centesimal da macroalga marinha vermelha *B. seaforthii*;
- Obter o PS-Bs;
- Analisar aspectos químicos do PS-Bs;
- Caracterizar a estrutura molecular do PS-Bs;
- Avaliar a toxicidade *in vitro* do PS-Bs;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* do PS-Bs;
- Estabelecer os aspectos clínicos e comportamentais avaliados no teste de toxicidade *in vivo* do PS-Bs;
- Correlacionar os parâmetros bioquímicos observados no teste de toxicidade *in vivo* do PS-Bs;
- Avaliar aspectos histológicos referentes ao teste de toxicidade *in vivo* do PS-Bs;
- Determinar o efeito antioxidante *in vitro* do PS-Bs.

4 PERMISSÃO LEGAL

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético desta tese de doutorado está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, protocolado sob número A482D49.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR ALVES, M. F., DE ALMEIDA BARRETO, F. K., DE VASCONCELOS, M. A., DO NASCIMENTO NETO, L. G., CARNEIRO, R. F., DA SILVA, L. T., NAGANO C.S., SAMPAIO A.H TEIXEIRA, E. H. Antihyperglycemic and antioxidant activities of a lectin from the marine red algae, *Bryothamnion seaforthii*, in rats with streptozotocin-induced diabetes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], 158, p. 773-780, 2020.
- 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.], 90., 28-34, 2019.
- ARAÚJO, I. W. F., VANDERLEI, E. D. S. O., RODRIGUES, J. A. G., COURA, C. O., QUINDERÉ, A. L. G., FONTES, B. P., BENEVIDES, N. M. B. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate polymers**, [s.l.], v. 86, n. 3, p. 1207-1215, 2011.
- ARMISEN, R; GALATAS, F. Production, properties and uses of agar. Production and utilization of products from commercial seaweeds. **FAO Fish. Tech. Pap**, [s.l.], v. 288, p. 1-57, 1987.
- AROKIARAJAN, M. S., THIRUNAVUKKARASU, R., JOSEPH, J., EKATERINA, O., ARUNI, W. Advance research in biomedical applications on marine sulfated polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 194, p. 870-881, 2022.
- BANACH, J. L., HOEK-VAN DEN HIL, E. F., VAN DER FELLS-KLERX, H. J. Food safety hazards in the European seaweed chain. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 332-364, 2020.
- BAKADIA, B. M., BONI, B. O. O., AHMED, A. A. Q., YANG, G. The impact of oxidative stress damage induced by the environmental stressors on COVID-19. **Life sciences**, [s.l.], v. 264, p. 118653, 2021.
- BILAL, M., IQBAL, H. M. Marine seaweed polysaccharides-based engineered cues for the modern biomedical sector. **Marine drugs**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 7, 2019.
- BIZZARO, G., VATLAND, A. K., PAMPANIN, D. M. The One-Health approach in seaweed food production. **Environment International**, [s.l.], v. 158, p. 106948. 2022.
- CALIRI, AW, TOMMASI, S., BESARATINIA, A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [s.l.], v. 787, p. 108365, 2021.
- CAI, J., LOVATELLI, A., AGUILAR-MANJARREZ, J., CORNISH, L., DABBADIE, L., DESROCHERS, A., DIFFEY S., GARRIDO G. E., GEEHAN J., HURTADO A., LUCENTE D., MAIR G., MIAO W., POTIN P., PRZYBYLA C., REANTASO M., ROUBACH R., TAUATI M., YUAN, X. Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**, [s.l.], n. 1229, 2021.

- CHUDASAMA, N. A., SEQUEIRA, R. A., MORADIYA, K., PRASAD, K. Seaweed polysaccharide based products and materials: an assessment on their production from a sustainability point of view. **Molecules**, [s.l], v. 26, n. 9, p. 2608, 2021.
- COULOMBIER, N., JAUFFRAIS, T., LÉBOUVIER, N. Antioxidant compounds from microalgae: A review. **Marine drugs**, [s.l], v. 19, n. 10, p. 549, 2021.
- DEMIRCI-ÇEKİÇ, S., ÖZKAN, G., AVAN, A. N., UZUNBOY, S., ÇAPANOĞLU, E., APAK, R. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, [s.l], v. 209, p. 114477, 2021.
- DOSSENA, S., MARINO, A. Cellular oxidative stress. **Antioxidants**, [s.l], v. 10, n. 3, p. 399, 2021.
- FERDOUS, U. T., YUSOF, Z. N. B. Medicinal prospects of antioxidants from algal sources in cancer therapy. **Frontiers in Pharmacology**, [s.l], v. 12, p. 593116, 2021.
- GUAN, J., LI, L., MAO, S. Applications of carrageenan in advanced drug delivery. In: **Seaweed Polysaccharides**. Elsevier, [s.l], p. 283-303, 2017.
- GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of toxicology**, [s.l] v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical society transactions**, [s.l], v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, [s.l], USA, 2015.
- HAJAM, Y. A., RANI, R., GANIE, S. Y., SHEIKH, T. A., JAVAID, D., QADRI, S. S., RESHI, M. S. Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives. **Cells**, [s.l], v. 11, n. 3, p. 552, 2022.
- HENKEL, R; SANDHU, I. S; AGARWAL, A. The excessive use of antioxidant therapy: a possible cause of male infertility? **Andrologia**, [s.l], v. 51, n. 1, p. e13162, 2019.
- HERMUND, D. B., YEŞİLTAŞ, B., HONOLD, P., JÓNSDÓTTIR, R., KRISTINSSON, H. G. JACOBSEN, C. Characterisation and antioxidant evaluation of Icelandic *F. vesiculosus* extracts in vitro and in fish-oil-enriched milk and mayonnaise. **Journal of Functional Foods**, [s.l], 19, 828-841, 2015.
- IONESCU-TUCKER, A., COTMAN, C. W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, [s.l], v. 107, p. 86-95, 2021.
- JONG, W. H., GEERTSMA, R. E., BORCHARD, G. Regulatory safety evaluation of nanomedical products: key issues to refine. **Drug Delivery and Translational Research**, [s.l], p. 1-6, 2022.
- KANG, J., JIA, X., WANG, N., XIAO, M., SONG, S., WU, S., ... GUO, Q. Insights into the structure-bioactivity relationships of marine sulfated polysaccharides: A review. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 123, p. 107049, 2022.

KALASARIYA, H. S., YADAV, V. K., YADAV, K. K., TIRTH, V., ALGAHTANI, A., ISLAM, S., JEON, B. H. Seaweed-based molecules and their potential biological activities: An eco-sustainable cosmetic. **Molecules**, [s.l], v. 26, n. 17, p. 5313, 2021.

KANAGARAJ, P., SOUNDARARAJAN, S., ELUMALAI, S., SADHASIVAM, D. R. Toxicity of Synthetic Anti-oxidant Butylated Hydroxyanisole on Growth and Development of Zebrafish Danio Rerio. **International Journal of Health Sciences**, [s.l], n. 2, p. 4039-4050, 2022.

KHAN, B. M., QIU, H. M., WANG, X. F., LIU, Z. Y., ZHANG, J. Y., GUO, Y. J., ... CHEONG, K. L. Physicochemical characterization of Gracilaria chouae sulfated polysaccharides and their antioxidant potential. **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 134, p. 255-261, 2019.

KRYLOVA, N. V., KRAVCHENKO, A. O., IUNIKHINA, O. V., POTT, A. B., LIKHATSKAYA, G. N., VOLOD'KO, A. V., ... YERMAK, I. M. Influence of the Structural Features of Carrageenans from Red Algae of the Far Eastern Seas on Their Antiviral Properties. **Marine drugs**, [s.l], v. 20, n. 1, p. 60, 2022.

KUMAR, M. S.; SHARMA, S. A. Toxicological effects of marine seaweeds: a cautious insight for human consumption. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s.l], v. 61, n. 3, p. 500-521, 2021.

LAJILI, S., AMMAR, H. H., MZOUGH, Z., AMOR, H. B. H., MULLER, C. D., MAJDOUB, H., BOURAOUI, A. 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, 2020.

LEANDRO, A.; PEREIRA, L.; GONÇALVES, A. M.M. Diverse applications of marine macroalgae. **Marine drugs**, [s.l], v. 18, n. 1, p. 17, 2019.

LEE, W. K.; LIM, Y. Y.; LEOW, A. T. C.; NAMASIVAYAM, P.; ABDULLAH, J. O.; HO, C. L. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 164, p. 23-30, 2017.

LIU, Z., SUN, X. A critical review of the abilities, determinants, and possible molecular mechanisms of seaweed polysaccharides antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l], v. 21, n. 20, p. 7774, 2020.

LOURENÇO, SC, MOLDÃO-MARTINS, M., ALVES, VD. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, [s.l], v. 24, n. 22, p. 4132, 2019.

LUO, J., MILLS, K., LE CESSIE, S., NOORDAM, R., VAN HEEMST, D. Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next? **Ageing research reviews**, [s.l], v. 57, p. 100982, 2020.

MAJUMDER, D., NATH, P., DEBNATH, R., MAITI, D. Understanding the complicated relationship between antioxidants and carcinogenesis. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s.l], v. 35, n. 2, p. e22643, 2021.

- MIRZANAJAFI-ZANJANI, M., YOUSEFI, M., EHSANI, A. Challenges and approaches for production of a healthy and functional mayonnaise sauce. **Food science & nutrition**, [s.l/], v. 7, n. 8, p. 2471-2484, 2019.
- MORAIS, S.M.D, JOVENTINO, F.P, MACHADO, M.I.L, MORAIS, M.M.D, SOUZA, R.T, FEITOSA, E.M.A Estudo químico de macroalgas do litoral do Ceará: *Cryptonemia luxurians* (Mertens) J. Agardh e *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kutzin, [s.l/], 2020.
- MUTHUKUMAR, J., CHIDAMBARAM, R., SUKUMARAN, S. Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries—A review. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l/], v. 58, n. 7, p. 2453-2466, 2021.
- NAN, F., FENG, J., LV, J., LIU, Q., FANG, K., GONG, C., & XIE, S. Origin and evolutionary history of freshwater Rhodophyta: further insights based on phylogenomic evidence. **Scientific Reports**, [s.l/], v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.
- NEHA, K., HAIDER, M. R., PATHAK, A., YAR, M. S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European journal of medicinal chemistry**, [s.l/], v. 178, p. 687-704, 2019.
- PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. **The polysaccharides**, [s.l/], v. 275, p. 118696, 2022. p. 195-285, 1983.
- PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**. [s.l/], 2009.
- POMIN, V. H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, [s.l/], v. 1820, n. 12, p. 1971-1979, 2012.
- QIU, S. M., AWEYA, J. J., LIU, X., LIU, Y., TANG, S., ZHANG, W., CHEONG, K. L. Bioactive polysaccharides from red seaweed as potent food supplements: A systematic review of their extraction, purification, and biological activities. **Carbohydrate Polymers**, [s.l/], v. 275, p. 118696, 2022.
- SÁNCHEZ, R. A. R., MATULEWICZ, M. C., CIANCIA, M. NMR spectroscopy for structural elucidation of sulfated polysaccharides from red seaweeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l/], 2021.
- SANCHEZ-MORATE, E., GIMENO-MALLENCH, L., STROMSNES, K., SANZ-ROS, J., ROMÁN-DOMÍNGUEZ, A., PAREJO-PEDRAJAS, S., MAS-BARGUES, C. Relationship between diet, microbiota, and healthy aging. **Biomedicines**, [s.l/], v. 8, n. 8, p. 287, 2020.
- SHAH, M. A., MIR, S. A. Plant extracts as food preservatives. In: **Plant Extracts: Applications in the Food Industry**. Academic Press, [s.l/], p. 127-141, 2022.
- SIES, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. **Antioxidants**, [s.l/], v. 9, n. 9, p. 852, 2020.
- SINGH, A., KUKRETI, R., SASO, L., KUKRETI, S. Mechanistic Insight into Oxidative Stress-Triggered Signaling Pathways and Type 2 Diabetes. **Molecules**, [s.l/], v. 27, n. 3, p. 950, 2022.

SOUSA, W. M.; SILVA, R. O.; BEZERRA, F. F.; BINGANA, R. D.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E.; SOMBRA, V. G.; SOARES, P. M.; FEITOSA, J. P.; DE PAULA, R. C.; SOUZA, M. H.; BARBOSA, A. L.; FREITAS, A. L. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 152, p. 140-148, 2016.

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.

VONA, R., PALLOTTA, L., CAPPELLETTI, M., SEVERI, C., MATARRESE, P. The impact of oxidative stress in human pathology: Focus on gastrointestinal disorders. **Antioxidants**, [s.l], v. 10, n. 2, p. 201, 2021.

WEINER, M. L. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies. **Critical reviews in toxicology**, [s.l], v. 44, n. 3, p. 244-269, 2014.

XU, X., LIU, A., HU, S., ARES, I., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R., WANG, X., MARTÍNEZ, M. A. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. **Food Chemistry**, [s.l], v. 353, p. 129488, 2021.

YANG, Y. J., NAM, S. J., KONG, G., KIM, M. K. A case-control study on seaweed consumption and the risk of breast cancer. **British Journal of Nutrition**, [s.l], v. 103, n. 9, p. 1345-1353, 2010.

VIANA, G. S. B., FREITAS, A. L. P., LIMA, M. M. L., VIEIRA, L. A. P., ANDRADE, M. C. H., BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red alga *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (SG Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l], 35, 713-72, 2002.

VIEIRA, L. A. P., FREITAS, A. L. P., FEITOSA, J. P. A., SILVA, D. C., & VIANA, G. S. B. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l], 37, 1071-1079, 2004.

ZHANG, Y., FU, X., DUAN, D., XU, J., GAO, X. Preparation and characterization of agar, agarose, and agaropectin from the red alga *Ahnfeltia plicata*. **Journal of oceanology and limnology**, [s.l], v. 37, n. 3, p. 815-824, 2019.

ZHENG, H., PEI, Y., HE, Y. L., LIU, Y., CHEN, M., HONG, P., QIAN, Z. J. A Sulfated Polysaccharide from Red Algae (*Gelidium crinale*) to Suppress Cells Metastasis and MMP-9 Expression of HT1080 Cells. **Foods**, [s.l], 11(15), 2360, 2022.

ZHU, K., YAO, S., ZHANG, Y., LIU, Q., XU, F., WU, G., TAN, L. Effects of in vitro saliva, gastric and intestinal digestion on the chemical properties, antioxidant activity of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Jackfruit) Pulp. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 87, p. 952-959, 2019.

**APÊNDICE A - SULFATED POLYSACCHARIDE FROM THE SEAWEED
Bryothamnion seaforthii: TOXICOLOGICAL AND ANTIOXIDANT EFFECTS**

Highlights

- A sulfated polysaccharide (SP-Bs) was isolated from the red seaweed *Bryothamnion seaforthii*.
- SP-Bs is an agaran-type galactan.
- SP-Bs exhibits antioxidant effect against different radicals *in vitro*.
- SP-Bs is not a toxic molecule.

Sulfated polysaccharide from the seaweed *Bryothamnion seaforthii*: toxicological and antioxidant effects

Francisco Diêgo da Silva Chagas ^a, Ana Paula Cavalcante Cesar ^a, José Gabriel de Sousa Cândido ^a, Laís Ramos Monteiro ^c, Venícios Gonçalves Sombra ^c, Lucas Henrique Marques Rodrigues ^b, João Lucas Silva Pinheiro ^b, Eduardo Carvalho Lira ^b, Renan Oliveira Silva Damasceno ^b, Regina Célia Monteiro de Paula ^c, Ana Lúcia Ponte Freitas ^a

^a Laboratory of Proteins and Carbohydrates of Marine Algae, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60455-760, CE, Brazil.

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, 50.670-901, PE, Brazil.

^c Laboratory of Polymers, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60455-760, CE, Brazil.

*Corresponding author Francisco Diego da Silva Chagas, Campus do Pici – Bloco 907, CEP 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil. Tel.: +55 88 996094908, Fax: +55 85 33669819. E-mail address: chagasdiegos@gmail.com

Abstract

Bryothamnion seaforthii is a tropical red seaweed with a high carbohydrate content ($75.05 \pm 0.21\%$). The sulfated polysaccharide of *Bryothamnion seaforthii* (SP-Bs) was obtained by enzymatic extraction and subjected to chemical characterization by colorimetric analysis, elemental microanalysis, SEM, GPC, FT-IR and NMR. SP-Bs toxicity was evaluated in *Artemia* sp. nauplii and BALB/c mice and its antioxidant effect against different radicals was investigated. In SEM analysis, SP-Bs exhibited a laminated morphology with short branched chains. GPC and elemental microanalysis revealed an average molar mass of 74.4 kDa and a degree of sulfation of 0.67, respectively. Furthermore, FT-IR and NMR showed that SP-Bs is a sulfated agaran. SP-Bs had no toxic effect in both tests performed and did not promote significant changes in clinical, biochemical and histological parameters in mice. This molecule exhibited a concentration-dependent antioxidant effect in total antioxidant capacity (2.48-98.64%), ferrous ion chelation (5.73-54.05%) and hydroxyl radical scavenging (13.79-72.27%). These results suggest that SP-Bs is a promising natural antioxidant, free from toxic effects.

Keywords

Sulfated polysaccharide; toxicity and antioxidant effect.

1. Introduction

Many marine macroalgae are used for human consumption, having many beneficial health effects in folk medicine, mainly in Asian countries (HWANG *et al.*, 2019). These organisms are sources of several compounds with multifunctional properties, such as minerals, carotenoids, phenolic compounds, terpenes, vitamins, amino acids, proteins, fatty acids and polysaccharides (COTAS *et al.*, 2020). In view of these varieties of compounds, marine algae polysaccharides are one of the most abundant and widely used by the industry (MUTHUKUMAR, CHIDAMBARAM, SUKUMARAN, 2021).

Sulfated polysaccharides from red seaweeds, also known as galactans, are widely used in the food and pharmaceutical industries (KANG *et al.*, 2022). They exhibit a repeating fundamental disaccharide unit composed of 3-linked β -galactopyranosyl (unit A) and 4-linked α -galactopyranosyl (unit B) residues (PEREZ-RECALDE *et al.*, 2016). Galactans are classified according to the B unit stereochemistry: when this unit exhibits D-series stereoisomerism the galactan is classified as a carrageenan, when its enantiomeric configuration belongs to the L-series it is classified as an agar (MERCEDES-PEREZ *et al.*, 2016).

Galactans obtained from seaweeds present a series of biological effects, among which we can highlight anticoagulant, antiviral, antibacterial antitumor effects. In addition, they have anticoagulant, anti-inflammatory, immunomodulatory, antidiabetic, antidiarrheal and antioxidant effects (KANG *et al.*, 2022; QIU *et al.*, 2022). Furthermore, sulfated polysaccharides from seaweeds are abundant in nature and usually non-toxic molecules (GUO, SKINNER, HARCUM, BARNUM, 1998; MUTHUKUMAR, CHIDAMBARAM, SUKUMARAN, 2021).

The seaweed *Bryothamnion seaforthii* is a rhodophyte commonly found in the Northeastern coast of Brazil. In addition, sulfated carbohydrates present in lectin fractions isolated from *B. seaforthii* were associated with antinociceptive effects (VIANA *et al.*, 2002). Furthermore, fractions containing carbohydrates isolated from *B. seaforthii* exhibited an antinociceptive effect (VIEIRA *et al.*, 2004). The lectin isolated from *B. seaforthii* was able to stimulate the restructuring of skin wounds due to its pro-healing effect (DO NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012). Besides, lectins isolated from this seaweed showed antihyperglycemic and antioxidant effects in rats with streptozotocin-induced diabetes (ALENCAR ALVES *et al.*, 2020). Thus, considering that studies on the chemical and structural characterization and toxicity aspects of the sulfated polysaccharides from *B. seaforthii* remain incipient, the present study aims to characterize the sulfated polysaccharide of *B. seaforthii* and evaluate its toxicity and antioxidant activity.

2. Materials and methods

2.1. Marine algae

The seaweed *Bryothamnion seaforthii* was collected in July 2018 on the Atlantic coast, Brazil (beach of Guajiru, Trairi, Ceará - 3°14'19"S and 39°13'52"W). The specimen is registered in SinGen under the code A482D49, with free access to collection and use. The species has an exsiccate (number 30.850) deposited in the herbarium Phycological from the Marine Sciences Laboratory of the Federal University of Ceará (UFC). After collection, the algae were transported to the Marine Algae Laboratory of the Department of Biochemistry and Molecular Biology at UFC.

2.2 Animals

Male BALB/c mice (25-30 g) were obtained from the Department of Physiology and Pharmacology Bioterium at UFPE, housed in temperature-controlled rooms, in a 12 h light/dark cycle and free access to water and standard food. All experimental procedures were previously approved by the Local Ethics Committee (Protocol No. 38/2021).

2.3 Proximate composition of *B. seaforthii* seaweed

After collection, the seaweed was thoroughly washed with running water to remove sand, salt, contaminating organisms and epiphytes. Afterwards, the seaweed was washed with distilled water and then dried at 25 °C for the proximate composition analysis. The protein, lipid, ash, and moisture contents of the *B. seaforthii* was determined according to the Association of Official Analytical Chemists standard protocol (AOAC, 2000). The seaweed's carbohydrate content was determined through weight difference, as follows: Carbohydrate content (%) = [100% – percentage of protein, lipid, ash and moisture].

2.4 Obtaining of the sulfated polysaccharide

The extraction of the sulfated polysaccharide was performed according to Farias *et al.*, 2000, with some modifications. Dried algae (5 g) was milled and suspended in 250 mL of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing EDTA (5 mM), cysteine (5 mM) and papain for 6 h (60 °C). The material obtained was filtered and the sulfated polysaccharide was precipitated by the addition of 16 mL of 10% cetylpyridinium chloride (CPC). The mixture was kept 24 h at 25°C and then filtered again. After that, 500 mL of CPC (0.05%) and 100 mL of a 2 M solution of NaCl/ethanol (100:15, v/v) were added to the polysaccharide sample. Finally, the polysaccharide was precipitated with the addition of 200 mL of absolute ethanol. After

incubation at 4°C for 24 h, the precipitate was filtered and washed with 80% ethanol, followed by absolute ethanol and then lyophilized. The sulfated polysaccharide obtained from *Bryothamnion seaforthii* is referred to as “SP-Bs”.

2.5 Chemical analysis

2.5.1. Determination of total carbohydrate and protein contents

The soluble carbohydrate content was estimated by the sulfuric acid-UV method using D-galactose as standard (ALBALASMEH, BERHE, GHEZZEHEI, 2013). The protein content was measured by the Bradford method, using bovine serum albumin (BSA) as standard (BRADFORD, 1976).

2.5.2. CHN/S analysis

The percentage of carbon, nitrogen, hydrogen and sulfur in SP-Bs was determined according to Maciel *et al.*, 2008 using a PerkinElmer 2400 Series II CHNS analyzer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The degree of sulfate group substitutions (DS sulfate) was calculated using the percentage of sulfur and carbon atoms as described by Melo *et al.*, 2002 using the following equation:

$$DS = 4.5 (\%S / \%C)$$

2.6 Scanning electron microscopy

The polysaccharide was observed through scanning electron microscopy (SEM) as described by Tang *et al.*, 2017. SP-Bs was evaluated using a scanning electron microscope (Quanta 450 FEG-FEI, USA). The lyophilized polysaccharide samples were coated with a thin layer of gold and then examined under high vacuum conditions under an accelerating voltage of 10 kV, using 150x, 500x, 1000x and 2000x magnifications.

2.7 Molecular weight determination

Gel permeation chromatography (GPC) was performed using an LC-20AD pump (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) with a medium containing a 1 mg/mL solution in 0.1 M NaNO₃. A differential refractometer was used as a detector (RID -10A, Shimadzu Co., Kyoto, Japan). Peak molar mass (M_{pk}) was determined using a 7.8 × 300 mm PolySep Linear column (Phenomenex, Torrance, United States) under an analysis flow of 1.0 mL/min. Pullulan samples (P-82, Shodex Denko, Tokyo, Japan) with weights between 103-106 mg/mol were used as a

standard to obtain the calibration curve:

$$\text{Log } M_w = 14.6827 - 1.06967V_e$$

Where V_e is the elution volume in mL. The linear correlation coefficient was 0.99.

2.8 FT-IR and NMR analysis

The FT-IR spectrum of PS-Bs (KBr pellets) was obtained on an IRTrace 100 spectrophotometer (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) between 400 and 4000 cm^{-1} . NMR spectra (^1H and ^{13}C) of SP-Bs (2.5% solutions in D_2O) were obtained using a Bruker Avance DRX 300 Fourier transform spectrometer (Billerica, Massachusetts, USA). The analysis was carried out at 70°C and sodium-3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3- d_4 was used as an internal standard (0.00 ppm). A distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT 135) spectrum was recorded using the pulse programs supplied with the apparatus.

2.9 Toxicity Study

2.9.1 Toxicity against *Artemia* sp. nauplii

The hatching of brine shrimp cysts was carried out in artificial sea water (3.5% salinity, 25°C), with constant aeration and lighting for 48 hours. For the toxicity test, 10 nauplii of *Artemia* sp. per tube were incubated for 24 hours with the SP-Bs samples. SP-Bs toxicity has been tested at concentrations ranging from 31 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Saline solution was used as a negative control and potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) as a positive control. The entire experiment was performed in triplicate and the percentage of deaths was calculated according to the equation below (MEYER *et al.*, 1982).

$$\text{Mortality (\%)} = \frac{\text{Total Nauplii} - \text{Live nauplii}}{\text{Total nauplii}} \times 100$$

2.9.2 Acute toxicity assessment

2.9.2.1. Toxicity study

Male BALB/c mice (25-30 g) received the SP-Bs (2000 mg/kg, p.o.) or saline, according to the Guide 407 of the OECD guidelines (OECD/OCDE, 2001). The animals were observed for 14 days, their blood was collected, and some organs (liver, kidney, spleen, heart, and lung) were weighed.

2.9.2.2. Clinical Observations

The clinical and behavioral aspects of the animals were evaluated according to Hippocratic screening on days 0 and 14, as described previously (MALONE, ROBICHAUD, 1962). The parameters analyzed included: body weight, motor activity, irritability, touch response, tail grip, contortion, straightening, cyanosis, body tone, grip strength, ataxia, corneal reflex, tremors, convulsions, Straub's tail, hypnosis, anesthesia, lacrimation, ptosis, urination, defecation, piloerection, breathing and death.

2.9.2.3. Biochemical Parameters

Blood samples were obtained for biochemical analysis. The parameters analyzed were albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase, creatinine, urea, glucose, and total cholesterol using standard commercial reagents (Labtest[®], Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa-MG, Brazil) according to the manufacturer's guidelines.

2.9.2.4 Organ Weight

The relative organ weight was determined using the following formula: Relative organ weight = (absolute organ weight / body weight) × 100 and the results were expressed in grams per 100 grams of body weight (g/100g) (GIORDANI *et al.*, 2015).

2.10 Antioxidant activity

2.10.1. Total antioxidant capacity

The SP-Bs total antioxidant capacity was based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V), as described by Prieto *et al.*, 1999. Initially, 300 µL of SP-Bs (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/mL) were added to a 3 mL solution containing the following reagents: ammonium molybdate solution (4 mM), sulfuric acid (0.6 M) and sodium phosphate (28 mM). After 90 min at 95 °C, the mixture was cooled and its absorbance was determined (695 nm). L-ascorbic acid (AA) was used as positive control and its antioxidant potential was considered as 100% activity. All reactions were performed in triplicate and results were expressed as an oxidation inhibition percentage, according to the following formula:

$$\text{Total antioxidant capacity (\%)} = [(A_1 - A_2)/(A_0 - A_2)] \times 100$$

where A_0 = AA; A_1 = SP-Bs; and A_2 = blank

2.10.2. Chelating ferrous ability

The SP-Bs chelating ability was determined according to the method of Chew *et al.*, 2008, with some modifications. Briefly, 1 mL of ferrous sulfate (0.1 mM) and 1 mL of ferrozine (0.25 mM) were added to SP-Bs (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/mL). After 10 min at room temperature the absorbance was measured at 562 nm against a blank (distilled water and reagents). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was used as positive control. All reactions were performed in triplicate and results were expressed as chelating activity percentage, as shown below:

$$\text{Chelating activity (\%)} = [A_0 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$$

where A_0 = FeSO₄ + Ferrozine; A_1 = SP-Bs or EDTA + FeSO₄ + Ferrozine; and A_2 = SP-Bs or EDTA without FeSO₄ + Ferrozine

2.10.3. Hydroxyl radical scavenging activity

The SP-Bs hydroxyl radical scavenging activity was determined according to Cao *et al.*, 2008, with modifications. Briefly, the SP-Bs (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/mL) was added to a mixture containing 1 mL of the following reagents: H₂O₂ (1 mM), ferrous sulfate (2 mM) and salicylate (6 mM) and incubated at 37 °C for 15 min. The absorbance was measured at 520 nm and L-ascorbic acid (AA) was used as positive control. All reactions were performed in triplicate and the hydroxyl radical scavenging percentage was calculated as follows:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = 1 - (A_1 - A_2) \times 100$$

where A_1 = SP-Bs; and A_2 = AA

2.11. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed statistically through analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. Differences were considered for p values lower than 0.05.

3. Results and Discussion

3.1. Centesimal composition of *B. seaforthii*, obtaining the polysaccharide and basic chemical analysis

The dry biomass of *B. seaforthii* presented $75.05 \pm 0.21\%$ of carbohydrates, $15.89 \pm 0.05\%$ of proteins, $0.19 \pm 0.03\%$ of lipids, $8.78 \pm 0.05\%$ of ash and $0.09 \pm 0.05\%$ moisture (Table 1). Environmental parameters such as rainfall, solar radiation, water temperature and salinity influence the proximate composition of seaweeds and promote variations in their protein, carbohydrate, lipid, ash and fiber contents (MARINHO-SORIANO, FONSECA, CARNEIRO, MOREIRA, 2006).

The high carbohydrate content ($75.05 \pm 0.21\%$) revealed by the proximate composition of *B. seaforthii* places this agarophyte as a natural source of these polymers and favors prospective studies of new carbohydrate-based products. Therefore, the enzymatic extraction of the sulfated polysaccharide fraction from *Bryothamnion seaforthii* (PS-Bs) was performed, which resulted in a yield of 9.2%. The yield and chemical characteristics of polysaccharides can be altered according to the extraction method used (KANG *et al.*, 2022)

PS-Bs is comprised of 91.4% total soluble carbohydrates and only traces of protein contaminants were detected (<1). Elemental microanalysis of PS-Bs revealed contents of 30.92% carbon, 0.07% nitrogen, 6.71% hydrogen and 4.64% sulfur (Table 1). This technique corroborated with the protein dosage colorimetric test, as only traces of nitrogen were shown in the sample. In addition, the degree of substitution for sulfate groups (DS sulfate) of SP-Bs was 0.67. This value is similar to the one obtained for the sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gelidiella acerosa* (0.63) (CHAGAS *et al.*, 2020). The sulfate content of the sulfated polysaccharides of seaweed varies depending on the different environmental conditions to which they are subjected (GÓMEZ-ORDÓÑEZ, JIMÉNEZ-ESCRIG, RUPÉREZ, 2011). In addition, multiple environmental stressors that prevail in aquatic environments with extremes are the probable cause for the production of sulfated polysaccharides (LEE, HO, 2022).

3.3. Structural characterization of PS-Bs

Digital photographs of SP-Bs are shown in Fig 1 A (0, 1, 2, 3 and 4). In image 1A₀ it is possible to see that SP-Bs has a fibrous and soft texture. Figures 1A 1, 2, 3 and 4 show SP-Bs at 150x, 500x, 1000x and 2000x magnifications, respectively. According to the magnifications, it is possible to see that SP-Bs has a laminated morphology with short branched chains distributed over most of the material. Furthermore, the higher the amplification used, the clearer the presence of rough structures on the SP-Bs surface.

The chromatogram obtained by SP-Bs gel permeation chromatography is presented as a polydispersed and homogeneous system (single peak) in 8.45 mL (Fig. 1B) representing a peak molar mass (M_{pk}) of 74.4 kDa. SP-Bs has a low average molar mass when compared to

the polysaccharides isolated from other agarophytes, such as ones obtained from *Gelidiella acerosa* (CHAGAS *et al.*, 2020) and *Gracilaria intermedia* (COSTA *et al.*, 2020) which weight 284.8 and 410 KDa, respectively.

The FT-IR spectrum of SP-Bs (Fig. 1C) exhibits the characteristic bands of an agaran-like galactan, focusing on regions 1373, 1261, 1068, 931, 891 cm^{-1} . The band at 931 cm^{-1} represents 3,6-anhydrogalactose (GOMEZ-ORDONEZ, RUPEREZ, 2011), while the bands at 891 and 848 cm^{-1} are equivalent to the single bond (C-H) on the anomeric carbon of β -galactose and β -D-galactose-4-sulfate, respectively (MELO, FEITOSA, FREITAS, PAULA, 2002). Furthermore, the presence of sulfate groups is represented by the bands at 1261 cm^{-1} and 1373 cm^{-1} (CHOPIN *et al.*, 1993, SÁNCHEZ, MATULEWICZ, CIANCIA, 2022).

The ^1H NMR spectrum of SP-Bs (Fig. 2A) exhibits characteristic peaks at δ 4.6, δ 5.1 and δ 5.2 which correspond to the anomeric protons of β -D-galactose (G), 3,6- α -L-anhydrogalactose (LA) and α -L-Galp-6-sulfate (L6S), respectively. Furthermore, the ^1H NMR spectrum also showed signals at δ 3.40 and δ 3.50, attributed to the methyl protons linked to C-6 of β -d-galactose (G6M) and to C-2 of 3,6-anhydrogalactose. (LA2M), respectively. Previous studies have also demonstrated this pattern of methylation in polysaccharides from other red algae species (ROCHAS *et al.*, 1986; ALENCAR *et al.*, 2019; SÁNCHEZ, MATULEWICZ, CIANCIA, 2022).

The ^{13}C NMR spectrum of SP-Bs (Fig. 2B) shows peaks corresponding to the anomeric carbons of β -D-galactose (δ 104.6), 3,6- α -L-anhydrogalactose (δ 100.5) and α -L-Galp-6-sulfate (δ 100.9). As in the ^1H NMR spectrum, the ^{13}C NMR spectrum also showed the characteristic signal of methylation at δ 61.2, attributed to the methyl proton linked to the C-6 of β -d-galactose (G6M) (COSTA *et al.*, 2020). The DEPT experiment was used to investigate the presence of oxymethylene groups in SP-Bs (Fig 2C). The DEPT spectrum shows signals at δ 74.2, δ 68 and δ 63.8 due to CH_2 protons.

3.4 Toxicological effect of PS-Bs

SP-Bs did not exhibit toxicity against nauplii *Artemia* sp. In contrast, potassium dichromate (positive control) showed a concentration-dependent toxicity response against *Artemia* sp. (Fig. 3). The only concentration of SP-Bs that caused nauplii death was the highest tested (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), with a death percentage of only 20%. On the other hand, at the lowest concentration (31 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ caused the death of 60% of the nauplii. Given the above, it is possible to conclude that even at the highest concentration tested, it was not possible to

reach a lethal concentration capable of promoting the death of 50% of *Artemia* sp. This toxicological bioassay is a simple, rapid and valid method for screening natural products and establishes that isolated compounds are considered toxic with $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982).

In a complementary way, the toxicity experiments in mice corroborate the tests in *Artemia* sp. The animals treated with SP-Bs did not show any change in the clinical and behavioral parameters evaluated, compared to control group. Thus, no morbidity or mortality was observed during the experimental protocol. In Hippocratic screening, physiological aspects such as urination, defecation and breathing were not altered with the oral administration of SP-Bs and reflex responses to the stimulus were preserved.

In accordance with the recommendations of the OECD Guideline 423, the limit dose of 2000 mg/kg of SP-Bs was tested in mice and showed no toxic effects on neurobehavioral parameters, vital organs, and its functions. Compared to control group, animals treated with SP-Bs had normal responses to external stimuli and maintained important physiological functions preserved. Moreover, the absence of lethality and signs of intoxication may indicate the safety of the SP-Bs administration by oral route (MOREIRA *et al.*, 2021).

Compared to saline group, animals that received SP-Bs had no significant changes in biochemical parameters of hepatic (albumin, AST, ALT, alkaline phosphatase levels), renal (creatinine and urea levels) or metabolic (total cholesterol levels) functions (Table 2).

Furthermore, different blood profile analyzes are routinely performed due to their clinical and pathophysiological importance in identifying and monitoring the functional status of organs and systems. In this way, it is known that enzymes produced in the liver and bile ducts, such as ALT, AST and alkaline phosphatase, are hepatotoxicity markers (ANTOINE *et al.*, 2009; OWOJUYIGBE *et al.*, 2021).

In the present study, animals treated with SP-Bs showed no significant change in the plasmatic levels of these markers, compared to control group, demonstrating that this molecule did not promote damage to the epithelial cells of the bile ducts and hepatocytes, nor did it change the hepatic synthesis function, evidenced by normal albumin levels (KAWAGUCHI *et al.*, 2021).

In this perspective, the kidneys were also evaluated in order to observe possible changes in their excretory function. Serum urea and creatinine are important markers of renal dysfunction and changes in their levels may indicate toxic effects on renal tubular cells (BUDU *et al.*, 2021; EZEJA, ANAGA, ASUZU, 2014). In our study, there were no significant differences in the levels of these markers in animals treated with SP-Bs, compared to control

group, demonstrating that SP-Bs administration does not change renal function.

Biochemical parameters of cell metabolism are important to assess physiological status disturbance. In this line, our results showed that the total cholesterol levels of mice treated with SP-Bs were not significantly different compared to control animals, suggesting that SP-Bs administration has no toxic effect on lipid metabolism (BURSILL, ABBEY, ROACH, 2007).

The relative organ weight (liver, kidneys, spleen, heart, and lungs) of mice treated with SP-Bs showed no significant difference compared to saline group (Table 2), there was also no change in body weight gain during the experimental protocol. These parameters are important, as organ weights are sensitive indicators of toxicity promoted by xenobiotics (PIAO, LIU, XIE, 2013).

Changes in the relative weight of major organs, such as liver and kidneys, may be related to histopathological changes caused by different cytotoxic agents. These changes can be directly caused by xenobiotics, such as changes in liver metabolism due to the destruction of cells in this organ, or indirectly, due to malnutrition or atrophy induced by reduced water consumption. (FARIA *et al.*, 2020). In this perspective, our results contribute to confirm the absence of toxic effect related to oral SP-Bs.

The macroscopic analysis revealed that the appearance of the organs of animals treated with SP-Bs was remarkably similar to the control group (data not shown). The macroscopic examination (liver, kidneys, spleen, heart, and lungs) did not reveal significant changes in the location, shape, size, color, and texture of these organs according to morphological parameters previously described (TRAN; TRAN, 2021).

3.5 Effects of PS-Bs in antioxidant activity

The antioxidant activity of *B.seaforthii* polysaccharide is shown in Fig. 4. The total antioxidant capacity is measured through the formation of the phosphomolybdenum complex (PRIETO, PINEDA, AGUILAR, 1999). The PS-Bs showed high activity in this test, with a concentration dependent effect (0.125-4 mg/mL) and a total antioxidant activity in the range of 2.48–98.64 %. At the highest concentration (4 mg/mL), the PS-Bs showed a similar effect to ascorbic acid (Fig. 5A). Moreover, the total antioxidant activity of PS-Bs was higher than other sulfated polysaccharide from red algae, such as *Solieria filiformis* (62.4%), in the same concentration (SOUSA *et al.*, 2016).

In a study by Yang *et al.*, (2011) the antioxidant potential of a native and a desulfated polysaccharide from the red algae *Corallina officinalis* were compared. The results showed that the native sulfated polysaccharide had better antioxidant activity, in the elimination and

reduction of free radicals, when compared to the derivatives that had the sulfate groups removed from the molecule. Therefore, the importance of sulfate groups for the total antioxidant activity is well known, making it possible to justify the antioxidant potential of SP-Bs, since that considerable sulfate amounts were observed by microanalysis. In addition, the FTIR and NMR spectra also revealed the presence of these chemical groups in the structure of SP-Bs.

The evaluation of the ferrous ion chelation potential is an important parameter to be investigated, due to the high reactive capacity of Fe^{2+} , which can lead to lipid peroxidation (CHUN-HUI, CHANG-HAI, ZHI-LIANG, YI., 2007). The PS-Bs showed the ability to inhibit iron chelation in a concentration-dependent manner (0.125-4 mg/mL / 5.73-54.05 %) (Fig. 5B). At the highest concentration tested, the sulfated polysaccharide showed a chelating activity of 56.65%.

Our results corroborate the fact that polysaccharides have antioxidant potential over iron and copper ions, acting through the mechanism of inhibition of free radical generation and not by the mechanism of elimination of these oxidizing agents (WANG, HU, NIE, YU, XIE, 2016). Furthermore, compounds containing in their structure more than one of the following functional groups, -OH, -SH, -COOH, -PO₃H₂, -C = O, -NR₂, -Sand -O-, are molecules with promising iron chelation potential (GULCIN, 2006). The chemical and structural characterization of PS-Bs confirms the presence of the functional groups, mentioned above, in the chemical skeleton of the sulfated polysaccharide obtained from *B. seaforthii*.

Radical hydroxyl is a potent free radical that can strongly interact with a large number of functional molecules, promoting strong cell damage tang *et al.*, 2017. The SP-Bs (0.125-4 mg/mL) showed activity ranging from 13.79-72.27 % (Fig. 5C). At a concentration of 2mg/mL, the sulfated polysaccharide inhibited the oxidation by 52,69%, demonstrating the efficacy of the sulfated polysaccharide from *B. seaforthii* as an antioxidant of natural origin and without chemical modification. In a previous work, it has been shown that the antioxidant activity on the hydroxyl radical is significantly increased with increasing DS (WANG, HU, NIE, YU, XIE, 2016).

4. Conclusion

The sulfated polysaccharide from the seaweed *Bryothamnion seaforthii* (SP-Bs) was characterized as a galactan-type sulfated agaran with laminated morphological characteristics. SP-Bs are free from toxic effects and showed considerable antioxidant effect against different types of radicals, revealing the potential of *B. seaforthii* polysaccharide as a natural molecule for future applications in the pharmaceutical industry.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Council for Advanced Professional Training (CAPES) and Research Council of the State of Ceará (Funcap). The authors also wish to acknowledge Animal Ethics Committee from UFPE for providing animals for experiments.

References

- ALBALASMEH A.A., BERHE A.A., GHEZZEHEI T.A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry, *Carbohydr. Polym.* 97 (2013) 253-261. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>.
- ALENCAR ALVES, M. F., DE ALMEIDA BARRETO, F. K., DE VASCONCELOS, M. A., DO NASCIMENTO NETO, L. G., CARNEIRO, R. F., DA SILVA, L. T., NAGANO C.S., SAMPAIO A.H TEIXEIRA, E. H. Antihyperglycemic and antioxidant activities of a lectin from the marine red algae, *Bryothamnion seaforthii*, in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Int. J. Biol. Macromol.* 158 (2020) 773-780. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.238>
- 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 Hydrocoll*, 90, (2019)., 28-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.007>
- ANTOINE, D. J., MERCER, A. E., WILLIAMS, D. P., PARK, B. K. Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. *Xenobiotica*, 39 (2009), 565-577, 17. doi:<https://doi.org/10.1080/00498250903046993>.
- BRADFORD M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- BUDU, A., FREITAS-LIMA, L. C., DE ARRUDA, A. C., PERILHÃO, M. S., BARRERA-CHIMAL, J., ARAÚJO, R. C., ESTRELA, G. R. Renal fibrosis due to multiple cisplatin treatment is exacerbated by kinin B1 receptor antagonism. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 54 (2021) doi: <https://doi.org/10.1590/1414-431X2021e11353>.
- BURSILL, C. A.; ABBEY, M.; ROACH, P. D. A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed

rabbit. *Atherosclerosis*, 193 (2007) 86–93. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerose.2006.08.033>.

CAO, X. X., LI, C. Q., Wang, Z. Z. Study on extraction and antioxidation of the flavonoids from *Anaphalis sinica* Hance form. *Pterocaula* (Franch. et Savat.) Ling. *Prog. Mod. Biomed*, 8 (2008), 691-693. doi: <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1076>.

COTAS, J., LEANDRO, A., PACHECO, D., GONÇALVES, A. M., PEREIRA, L. A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta). *Life*, (2020). 10(3), 19. doi: <https://doi.org/10.3390/life10030019>

CHAGAS, F. D. S.; LIMA, G. C.; DOS SANTOS, V. I. N.; COSTA, L. E. C.; DE SOUSA, W. M.; SOMBRA, V. G.; 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 alga *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 159 (2020) 415–421.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.012>

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. Sci. Technol.* 41 (2008) 1067-1072.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.013>.

CHOPIN, THIERRY; WHALEN, ELLEN. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohydr. Res.*, 246 (1993), 51-59. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)84023-Y](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)84023-Y)

COSTA, L. E. C., BRITO, T. V., DAMASCENO, R. O. S., SOUSA, W. M., BARROS, F. C. N., SOMBRA, V. G., JÚNIOR J. S. C., MAGALHÃES D. A., SOUZA M. H.L.P., MEDEIROS J.V.R., DE PAULA R. C. M., BARBOSA A. L. R., FREITAS, A. L. P. Chemical structure, anti-inflammatory and antinociceptive activities of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria intermedia* algae. *Int. J. Biol. Macromol.* 159 (2020). 966-975.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.166>

CHUN-HUI L., CHANG-HAI W., ZHI-LIANG X., YI W., Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of

Aloe barbadensis Miler irrigated with sea water, *Process. Biochem.* 42 (2007) 961-970. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.03.004>.

DO NASCIMENTO-NETO, L. G., CARNEIRO, R. F., DA SILVA, S. R., DA SILVA, B. R., VASSILIEPE SOUSA ARRUDA, F., CARNEIRO, V. A., NASCIMENTO K.S, SAKER-SAMPAIO S, SILVA V.A, PORTO A.L.S, CAVADA B.S, SAMAPAIO A.H, TEIXEIRA E.H, NAGANO, C. S. Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. *Mar. drugs*, (2012), 1936-1954. doi: <https://doi.org/10.3390/md10091936>.

EZEJA, M. I.; ANAGA, A. O.; ASUZU, I. U. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 151 (2014) 1155–1164, 12. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.034>.

FARIA, WCS, DA SILVA, AA, VEGGI, N., KAWASHITA, NH, DE FRANÇA LEMES, SA, DE BARROS, WM, CARDOSO E.C, CONVERTI A, MOURA W.M, BRAGAGNOLO, N. Acute and subacute oral toxicity assessment of dry encapsulated and non-encapsulated green coffee fruit extracts. *JFDA*, 28, (2020).337–355, doi: 10.38212/2224-6614.1067.

FARIAS W.R., VALENTE A.P., PEREIRA M.S., MOURÃO P.A., 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, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 29299-29307. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M002422200>.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ E., JIMÉNEZ-ESCRIG A., RUPÉREZ P., Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC), *Talanta* 93 (2012) 153-159. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.067>.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, Eva; RUPÉREZ, Pilar. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocoll.*, 25, (2011) 1514-1520. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>

GIORDANI, MA, COLLICCHIO, TCM, ASCÊNCIO, SD, DE OLIVEIRA MARTINS, DT, BALOGUN, SO, BIESKI, IGC, SILVA L.A, COLODEL E.M, SOUZA R.L, SOUZA D.L.P, FRANÇA S.A, ANDRADE C.M.B KAWASHITA, NH. Hydroethanolic extract of the inner stem bark of *Cedrela odorata* has low toxicity and reduces hyperglycemia induced by an overload of sucrose and glucose. *J. Ethnopharmacol*, 162 (2015) 352–361. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.059>

GÜLÇİN İ., Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, *Life sci*. 78 (2006) 803-811. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.103>

GUO J.H., SKINNER G.W., HARCUM W.W., BARNUM P.E., Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers, *Pharmaceut. Sci. Tech. Today* (1998) 254-261. doi: [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(98\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(98)00072-8).

HWANG, E. K., YOTSUKURA, N., PANG, S. J., SU, L., & SHAN, T. F. Seaweed breeding programs and progress in eastern Asian countries. *Phycologia*, 58 (2019) 484-495. <https://doi.org/10.1080/00318884.2019.1639436>.

KANG, J., JIA, X., WANG, N., XIAO, M., SONG, S., WU, S., WANG S, CUI S.W, GUO, Q. Insights into the structure-bioactivity relationships of marine sulfated polysaccharides: A review. *Food Hydrocolloids*, 123 (2022) 107049. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107049>

KAWAGUCHI, K., SAKAI, Y., TERASHIMA, T., SHIMODE, T., SEKI, A., ORITA, N., TAKESHITA Y, SHIMAKAMI T, YAMASHITA T, TAKAMURA M, MIZUKOSHI E, TAKAMURA T, HONDA M, WADA T, KANEKO, S. Decline in serum albumin concentration is a predictor of serious events in nonalcoholic fatty liver disease. *Medicine*, 100 (2021) 26835. doi: 10.1097/MD.00000000000026835.

LEE, W. K., & HO, C. L. Ecological and evolutionary diversification of sulphated polysaccharides in diverse photosynthetic lineages: A review. *Carbohydr. Polym.*, 277, (2022)., 118764. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118764>.

MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold extracted fraction of

soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydr. Polym.*, 71, (2008), 4, 559-565. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.06.026>.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*, 25 (1962) 320-332.

MARINHO-SORIANO, E., FONSECA, P. C., CARNEIRO, M. A. A., & MOREIRA, W. S. C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour. Technol.*, 97 (2006), 2402-2406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.014>

MELO M.R.S., FEITOSA J.P.A., FREITAS A.L.P., DE PAULA R.C.M, Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*, *Carbohydr. Polym.* 49 (2002) 491-498. doi: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00006-1).

MERCEDES-PEREZ R., CANELÓN D.J., COMPAGNONE R.S., MATULEWICZ M.C., CEREZO A.S., CIANCIA M., Carrageenan and agaran structures from the red seaweed *Gymnogongrus tenuis*, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 1370-1378. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.007>.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E. J., MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta med*, 45 (1982), (05), 31-34. doi: 10.1055/s-2007-971236

MOREIRA, LA, OLIVEIRA, LP, MAGALHÃES, MR, OLIVEIRA, SA, OLIVEIRA-NETO, JR, CARVALHO, PM, CUNHA, LC Acute toxicity, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of the orally administered crotamine in mice. *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol*, 394 (2021) 1703–1711. doi: <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02103-4>

MUTHUKUMAR, J; CHIDAMBARAM, R; SUKUMARAN, S. Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries—A review. *JFST* 58 (2021) 2453-2466. doi: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04837-0>

OECD/OCDE. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. OECD, 423 (2001).

OWOJUYIGBE, OS, LARBIE, C., FIREMPONG, CK, KOMLAGA, G., EMIKPE, BO, & OYAGBEMI, A.A. Hura crepitans stem bark extract: A potential remedy to sub-acute liver damage., *J. Ethnopharmacol.* 284 (2022) 114768, 10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114768>

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*. *Carbohydr. Polym.*, 136 (2016). 1370-1378. doi: [10.1016/j.carbpol.2015.10.007](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.007).

PIAO, Y.; LIU, Y.; XIE, X. Change trends of organ weight background data in Sprague Dawley rats at different ages *J. Toxicol. Pathol.*, 26 (2013) 29–34. doi: <https://doi.org/10.1293/tox.26.29>

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, *Anal. Biochem.* 269 (1999) 337-341. doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>

QIU, S. M., AWEYA, J. J., LIU, X., LIU, Y., TANG, S., ZHANG, W., CHEONG, K. L. Bioactive polysaccharides from red seaweed as potent food supplements: A systematic review of their extraction, purification, and biological activities. *Carbohydr. Polym.*, 275, (2022), 118696. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118696>

ROCHAS, C., LAHAYE, M., & YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. (1986). doi: <https://doi.org/10.1515/botm.1986.29.4.335>

SÁNCHEZ, R. A. R., MATULEWICZ, M. C., CIANCIA, M. NMR spectroscopy for structural elucidation of sulfated polysaccharides from red seaweeds, *Int. J. Biol. Macromol*, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.080>.

SOUSA W.M., SILVA R. O, BEZERRA F.F., BINGANA R.D., BARROS F.C.N COSTA., L.E., SOMBRA V.G, SOARES P.M.G, FEITOSA J.P.A, DE PAULA R.C.M., SOUZA M.H.L.P, BARBOSA A.L.R, FREITAS A.L.P., Sulfated polysaccharide fraction from marine

algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects, Carbohydr. Polym. 152 (2016) 140-148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.111>

TANG, Y L. CHEN, Z. JIANG, S. ZHONG, W. CHEN, F. ZHENG, G. SHI, Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia livida*, Int. J. Biol. Macromol. 94 (2017) 642-652. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.067>.

TRAN, P.-N. T.; TRAN, T. T. N. Evaluation of Acute and Subchronic Toxicity Induced by the Crude Ethanol Extract of *Plukenetia volubilis* Linneo Leaves in Swiss Albino Mice. Biomed Res. Int., (2021)1–13 doi: <https://doi.org/10.1155/2021/6524658>.

VIANA, G. S. B., FREITAS, A. L. P., LIMA, M. M. L., VIEIRA, L. A. P., ANDRADE, M. C. H., BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (SG Gmel.) M. Howe. Braz. J. Med. Biol., (2002). 35, 713-72. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000600012>

VIEIRA, L. A. P., FREITAS, A. L. P., FEITOSA, J. P. A., SILVA, D. C., & VIANA, G. S. B. The alga *Bryothamnion seforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. BJMBR, 37 (2004), 1071-1079. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000700017>

WANG J., HU S., NIE S., YU Q., XIE M., Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides, Oxid. Med. Cell. Longev. 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/5692852>

YANG Y, LIU D., WU J., CHEN Y., WANG S., In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*, Int. J. Biol. Macromol. 49 (2011) 1031-1037. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.08.026>

Figure captions:

Fig 1. Photography, MEV, GPC and FTIR of *B. seaforthii* sulfated polysaccharide. (A) Photography and SEM images at 150x, 500x, 1000x and 2000x magnifications (B) GPC curve and (C) FTIR spectra (1400-700 cm^{-1}).

Fig. 2. NMR spectroscopy. (a) ^1H , (b) ^{13}C , and (c) DEPT of SP-Bs.

Fig 3. Toxicity of OS-Bs against nauplius of *Artemia* sp.

Fig 4. Effect of *B. seaforthii* sulfated polysaccharide in antioxidant activity. (A) Total antioxidant capacity; (B) Iron chelating activity; (C) Hydroxyl radical scavenging activity. Values are expressed in % Mean \pm S.E.M. ($n = 3$). ANOVA and Bonferroni test. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) compared to each other.

Fig. 1

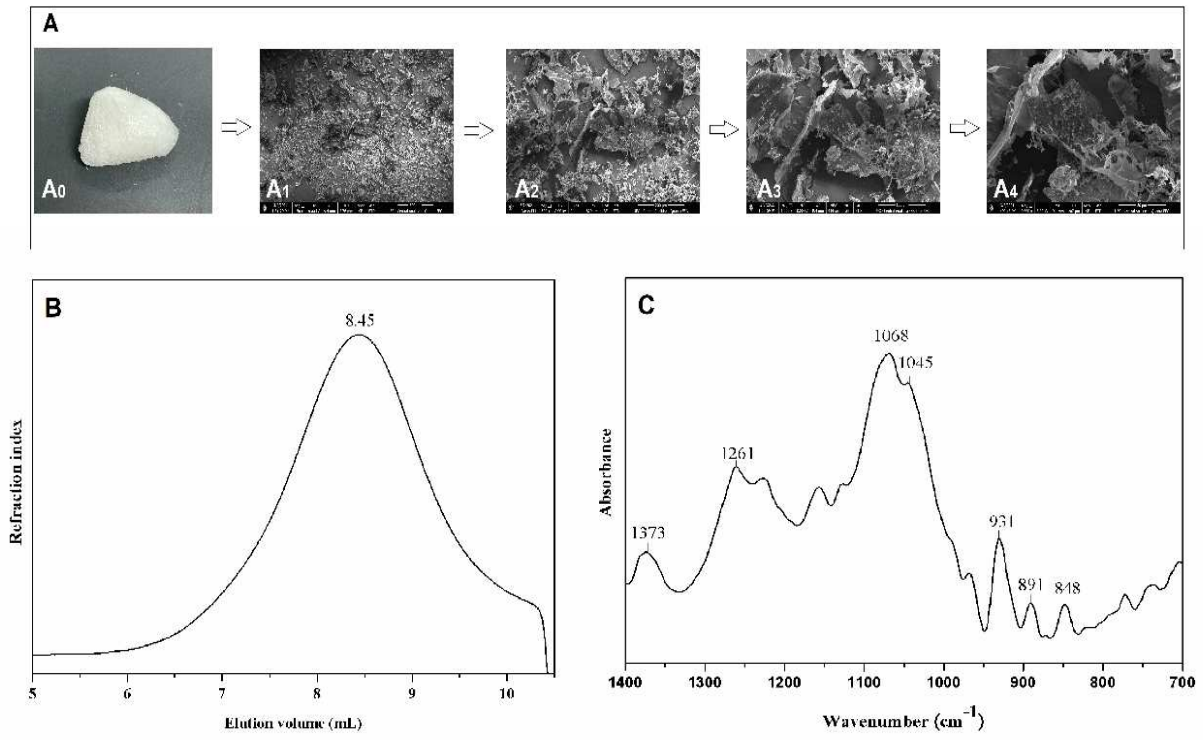


Fig. 2

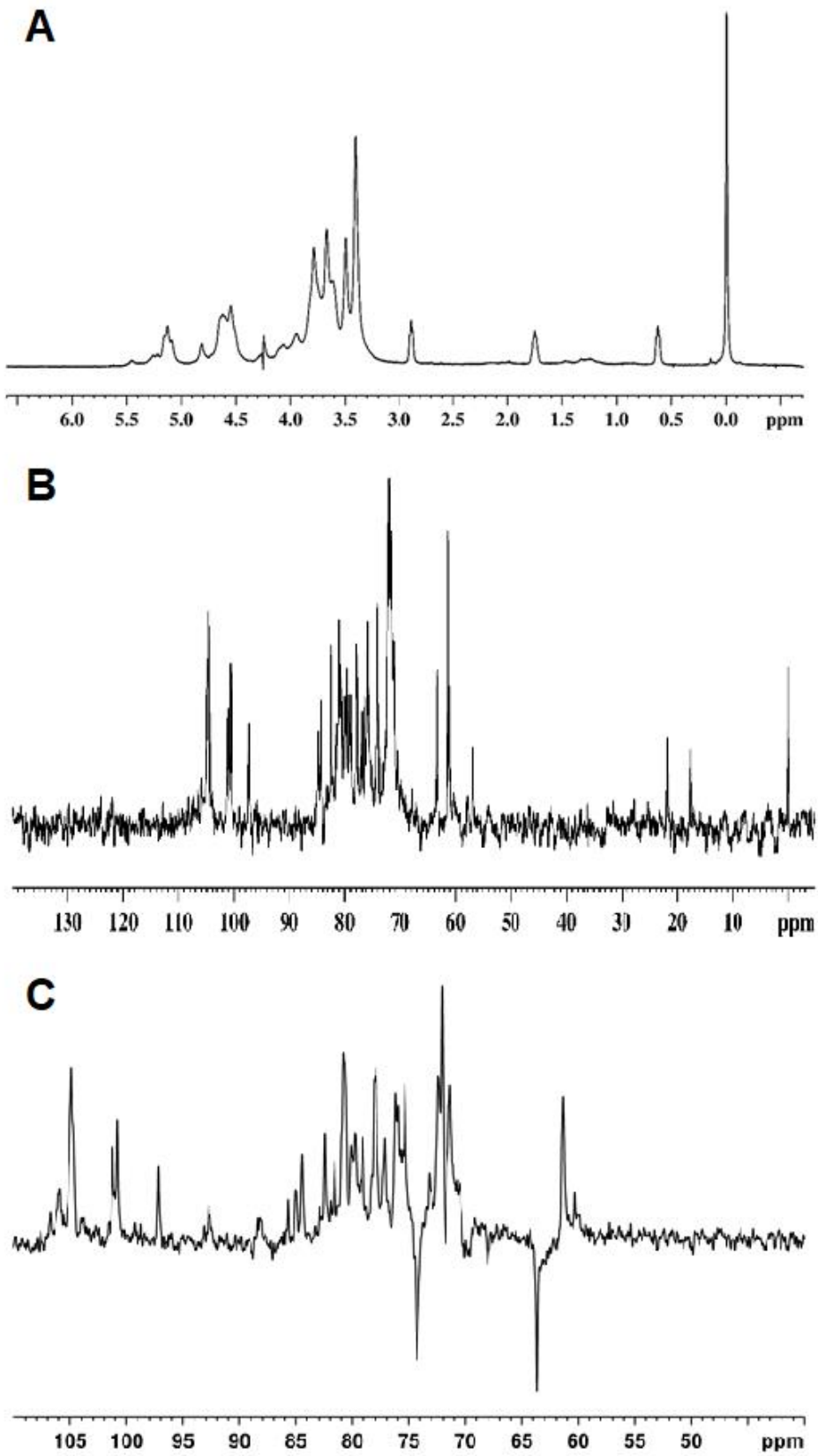


Fig. 3

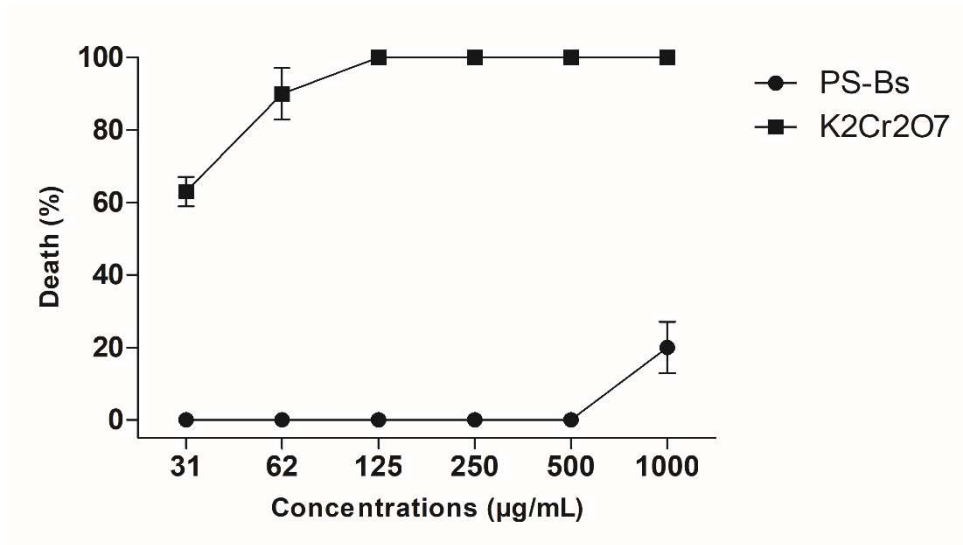


Fig. 4

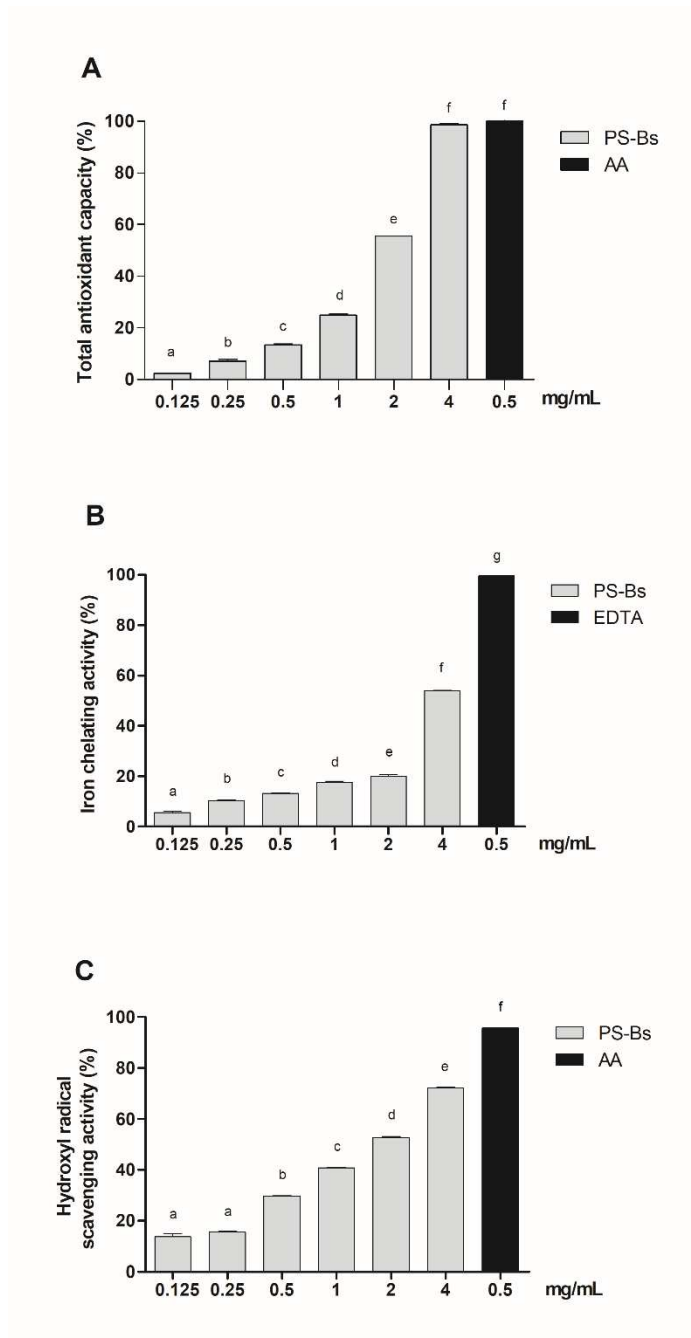


Table 1

Centesimal composition from seaweed *B. seaforthii*, Chemical and CNH/S analysis of the SP-Bs.

Centesimal composition							
Sample	Carbohydrates (%)	Proteins (%)	Lipids (%)	Moisture (%)	ash (%)		
<i>B. seaforthii</i>	75.05 ± 0,21	15.89 ± 0,05	0.19 ± 0,03	0.09 ± 0,05	8.78 ± 0,05		
Chemical and CNH/S analysis							
Sample	Carbohydrate(%) ^a	Protein(%) ^b	Sulfate(%) ^c	CNH/S analysis (%) ^c			
				C	N	H	S
SP-Bs	91.45	<1	0.67	31.92	0.07	6.71	4.64

^a determined according to Albalasmeh *et al.*, (2013).

^b determined according to Bradford (1976).

^c determined by microanalysis according to Maciel *et al.*, (2008)

Table 2

Effect of a sulfated polysaccharide from *B. seaforthii* (SP-Bs) on the biochemical parameters and relative organ weight of mice.

Parameter	Saline	SP-Bs
Biochemical parameters		
Albumin (g/dL)	2.27 ± 0.26	2.40 ± 0.17
Alanine aminotransferase (U/L)	47.92 ± 2.14	45.27 ± 1.71
Aspartate aminotransferase (U/L)	91.06 ± 2.14	85.99 ± 2.90
Alkaline Phosphatase (U/L)	54.22 ± 5.05	56.27 ± 2.81
Creatinine (mg/dL)	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.01
Urea (mg/dL)	48.33 ± 2.95	47.42 ± 4.04
Total Cholesterol (mg/dL)	137.50 ± 8.93	120.30 ± 6.51
Relative organ weight		
Liver (g/100g)	5.088 ± 0.158	5.410 ± 0.186
Kidney (g/100g)	1.706 ± 0.058	1.699 ± 0.056
Spleen (g/100g)	0.374 ± 0.005	0.437 ± 0.005
Lung (g/100g)	0.599 ± 0.042	0.668 ± 0.052
Heart (g/100g)	0.561 ± 0.039	0.519 ± 0.040