



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

LUCAS ALIGHIERI NEVES COSTA BATISTA

**CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES RICAS EM POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA ALGA MARROM *Dictyopteris delicatula* E AVALIAÇÃO DO
SEU POTENCIAL ANTIUROLÍTICO, A PARTIR DA DETERMINAÇÃO DE SUAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E MODULADORA DA CRISTALIZAÇÃO DE
OXALATO DE CÁLCIO**

**NATAL/RN
2019**

LUCAS ALIGHIERI NEVES COSTA BATISTA

**CARACTERIZAÇÃO DE FRAÇÕES RICAS EM POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA ALGA MARROM *Dictyopteris delicatula* E AVALIAÇÃO DO
SEU POTENCIAL ANTIUROLÍTICO, A PARTIR DA DETERMINAÇÃO DE SUAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E MODULADORA DA CRISTALIZAÇÃO DE
OXALATO DE CÁLCIO**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Bioquímica.
Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha

**NATAL/RN
2020**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Batista, Lucas Alighieri Neves Costa.

Caracterização de frações ricas em polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Dictyopteris delicatula* e avaliação do seu potencial antiurolítico, a partir da determinação de suas atividades antioxidante e moduladora da cristalização de oxalato de cálcio / Lucas Alighieri Neves Costa Batista. - Natal, 2020. 125 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

1. Heterofucanas - Dissertação. 2. Algas marinhas - Dissertação. 3. Urolitíase - Dissertação. 4. Cálculos renais - Dissertação. 5. Ácido alginico - Dissertação. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 582.272


LUCAS ALIGUIERI NEVES COSTA BATISTA

Caracterização de Frações Ricas em Polissacarídeos Sulfatados da Alga Marrom *Dictyopteris delicatula* e Avaliação do seu Potencial Antiurolítico, a partir da Determinação de suas Atividades Antioxidante e Moduladora da Cristalização de Oxalato de Cálcio


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 27/03/2020.

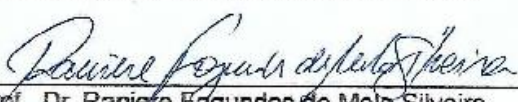
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Hugo Alexandre Oliveira Rocha
Orientador/Presidente - UFRN



Prof. Dr. Katia Castanho Scortecci
Examinadora Interna ao Programa - UFRN



Prof. Dr. Raniera Fagundes de Melo Silveira
Examinadora Externa à Instituição - UNINASSAU

AGRADECIMENTOS

Agradeço os meus fundamentos

A Dona Tereza, minha mãe. Acredito, assim como Machado de Assis, que o menino é pai do homem. Portanto, agradeço a ti pelo menino que educaste e que resultou no homem que me tornei.

A Linda Marta, minha tia querida. Agradeço a ti pelo carinho, cuidado e dedicação constante tanto para mim como para meus irmãos.

Ao meu pai, agradeço o exemplo de homem e pessoa íntegra que você me deu.

A Pedro, meu irmão artista e jovem, felizmente o segundo o tempo tratará de curar. Agradeço o seu coração belo que nunca demonstrou maldade, conviver com você foi e é uma lição para a vida.

A Ana Júlia (Jujubinha), minha irmãzinha querida que herdou toda desenvoltura da família.

Você é um “Anju” com quem sou muito feliz de poder conviver e acompanhar o desenvolvimento desde o berço.

Agradeço ao meu primo irmão Brenno, meu parceiro dialético (estou lendo Platão) nas primeiras discussões científicas e quiçá filosóficas. Sem dúvidas essas conversas foram cruciais para que escolhesse esse caminho científico. Infelizmente você virou programador. Tô brincando.

Aos meus mestres

Agradeço a todos os meus professores, desde os níveis fundamentais até o superior. O conhecimento é uma construção e um de vocês desempenharam sua função na minha formação acadêmica e pessoal.

Contudo, acho justo fazer um agradecimento especial ao meu professor de xadrez, José Damião. O xadrez me ensinou sobre a vida, escolhas, derrotas, vitórias, o valor da calma e uma lição fundamental: bons lances e boas posições não surgem ao acaso, mas são construídos num processo lento e trabalhoso.

Ao meu orientador Hugo agradeço sua dedicação constante em todas as etapas de realização desse trabalho. Sócrates, talvez um dos primeiros professores dentro do conceito moderno que temos hoje, se considerava um parteiro, pois dizia que retirava de seus alunos o conhecimento num processo árduo e dolorido, porém sucedido de alegria e satisfação, assim como um parto. Bem, a realização deste trabalho foi um parto.

Aos meus amigos e colegas do BIOPOL

Agradeço a Cynthia, Raynara, Rony Lucas, Wesley, Jayanne, Lucas Lisboa, Maylla, Izabella, Marília, Karoline, Dayanne, Moacir. Me reservo o direito a um agradecimento especial ao Major Rony Lucas, meu amigo e futuro sócio num negócio de criação e engorda de gado e a minha querida amiga Cynthia, com a qual em cinco anos de amizades nunca discuti ou briguei.

As bancas examinadoras

Agradeço aos professores Ranieri, Diego e Leonardo e às professoras Kátia e Marília pela dedicação e disposição, todas as observações e sugestões foram de grande valia para a aprimoração deste trabalho.

Por fim, agradeço a este trabalho, e por que não? Este desafio que não só aprimorou meus conhecimento e habilidades como demonstrou a mim a minha própria capacidade, ele também merece meu agradecimento.

Resumo

Fucanas e fucoidans são polissacarídeos que contêm alfa-L-fucose sulfatada em sua constituição e são encontrados quase que exclusivamente em algas marrons, atribui-se a essas moléculas diversas atividades farmacológicas como: anticoagulante, antitrombótica, antiproliferativa, antinociceptiva osteogênica. A ampla presença de grupamentos sulfato, e as vezes carboxila, nas fucanas e fucoidans confere a essas moléculas uma elevada carga negativa, o que é uma característica comum nos inibidores da formação de cálculos renais de oxalato de cálcio (CaOx), por isso, considera-se que as fucanas e fucoidans têm elevado potencial como agentes antiurolíticos. Outro ponto positivo para as fucanas e fucoidans com relação sua atividade antiurolítica é as suas propriedades antioxidantes, pois como o estresse oxidativo participa do processo de formação de cálculos renais, a ação antioxidante é considerada como preventora da urolitíase. Contudo, poucas fucanas e fucoidans, menos de dez, foram avaliados nesse sentido. Tendo isso em mente, assim como, a questão da carga negativa e a atividade antioxidante como fatores chave para atividade antiurolítica, no presente estudo teve-se como objetivo avaliar o potencial antiurolítico de polissacarídeos extraídos da macroalga *Dictyopteris delicatula*, uma macroalga amplamente encontrada em todo o litoral nordeste do Brasil, por meio da análise da influência desses polissacarídeos na cristalização do CaOx *in vitro* e da capacidade deles em prevenir o estresse oxidativo em células proveniente do epitélio renal (MDCK). Polissacarídeos de *D. delicatula* foram extraídos por proteólise a quente e fracionados por meio de precipitação com volumes crescente de acetona em cinco diferentes frações: F0,5v, F0,7v, F1,0v, F1,5v e F2,0v. Análise da composição dessas frações mostrou que se tratavam de frações ricas em polissacarídeos sulfatados (FRPS) contendo fucose. Na presença das FRPS os cristais CaOx foram menores, mais numerosos e com carga superficial altamente negativa. Destacou-se a atividade modulatória da F0,5v (0,1 mg/mL), cuja presença na cristalização aumentou 1721 vezes o número de cristais formados; reduziu em mais de 90% o tamanho dos cristais; aumentou a carga negativa da superfície de -7 mV para -35 mV e impediu completamente a formação de cristais CaOx monoidratados. Muitos destes efeitos ainda foram visualizados quando F0,5v foi avaliada em concentrações menores (0,02 – 0,01 mg/mL). Quando avaliada em condições de cultivo celular, F0,5v (0,5 mg/mL) inibiu por completo o efeito do peróxido de hidrogênio em diminuir a viabilidade de células MDCK. Portanto, esta foi escolhida para ser melhor caracterizada. Assim, a F0,5v foi submetida a cromatografia de troca iônica e foram obtidas cinco subfrações: 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M e 1.0 M. A caracterização química da F0,5v e das suas subfrações revelaram que essas são constituídas principalmente por fucose, glucose, ácido urônico e sulfato. As atividades antioxidante e moduladora da cristalização de CaOx de nenhuma das subfrações foi superior às atividades da F0,5v, indicando que a F0,5v é mais potente quando não está fracionada. Em suma, F0,5v foi capaz de sequestrar 79% dos radicais hidroxila, 10% dos radicais superóxido, 22% do óxido nítrico e teve atividade antioxidante equivalente a 31 mg de ácido ascórbico. E com relação a modulação dos cristalização, na presença das subfrações foi observado redução no número e aumento no tamanho dos cristais CaOx, exceto quando utilizou-se 0.2 M e 0.6 M. Considerando a atividade antioxidante e modulatória da cristalização do CaOx promovida pela F0,5v, concluiu-se que essa fração tem potencial em prevenir a formação de cálculos renais de CaOx mais promissor que as suas subfrações.

Palavras-chave: heterofucanas, algas marinhas, urolitíase, cálculos renais e ácido algínico

Abstract

Fucans and fucoidans are polysaccharides that contain sulfated L-fucose in their constitution and are found in brown algae, several pharmacological activities are attributed to these molecules such as: anticoagulant, antithrombotic, antiproliferative, anti-nociceptive, osteogenic and others. Wide presence of carboxyl and sulfate groups in fucans and fucoidans gives these molecules a high negative charge, which is a common characteristic of inhibitors of calcium oxalate (CaOx) kidney stones formation, so fucans and fucoidans are probably antiurolithic agents, which has already been demonstrated in some studies. Antiurolithic activity is also related to reduction of oxidative stress in renal tubules therefore fucans and fucoidans are also considered antiurolithic due to their antioxidant action. Considering the negative charge and antioxidant activity as a key factor for antiurolithic activity, the present study aims to evaluate the antiurolithic potential of polysaccharides extracted from the macroalgae *Dictyopteria delicatula* - a macroalgae widely found throughout the northeastern coast - through analysis of these polysaccharides effect in CaOx crystallization and their potential to prevent oxidative stress in MDCK cells. *D. delicatula* total polysaccharides were extracted by proteolysis and fractionated by precipitation with increasing volumes of acetone in five different fractions: F0.5v, F0.7v, F1.0v, F1.5v and F2.0v. Fractions compositions was determined by physical-chemical analysis, which proved they were sulfated polysaccharides rich fractions (SPRF). CaOx crystallization was induced in vitro by adding sodium oxalate to a solution of calcium chloride, which contained or not one of the FRPS solution. When formed in the presence of FRPS, CaOx crystals are smaller, more numerous and with a highly negative surface charge, with emphasis on the F0.5v modulatory activity, whose presence in crystallization increased 1721 times the number of crystals formed, reduced by more than 90 % crystals size, increased the negative charge on the surface from -7 mV to -35 mV and completely prevented the formation of monohydrated CaOx crystals, based on these results the F0.5v was chosen to be better evaluated. F0.5v was fractionated by ion exchange chromatography and five subfractions were obtained: 0.2 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M and 1.0 M. The chemical characterization of F0.5v and its subfractions revealed that F0.5v is consisting of alginate, heterofucans and laminarin. The antioxidant and CaOx crystallization modulating activities of none of the subfractions were superior to the activities of unfractionated F0.5v, indicating that F0.5v is more efficient when in the native form. Regarding the antioxidant activity, F0.5v was able to scavenge 79% of hydroxyl radicals, 10% of superoxide radicals, 22% of nitric oxide and have antioxidant capacity equivalent to 31 mg of ascorbic acid, in addition it has antioxidant activity *ex vivo* and increased up from 55% to 100% the viability of renal cells exposed to hydrogen peroxide, as for the modulation in crystallization, F0.5v, even in small concentrations like 0.01 mg / mL, promotes heterogeneous nucleation and the formation of small, dihydrated and unaggregable crystals. Considering the antioxidant and modulatory activity of CaOx crystallization of F0.5v we conclude this compound has the potential to prevent the formation of renal CaOx stones.

Keywords: heterofucans, brown algae, antioxidant, kidney stones and sulfated polysaccharides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica de um néfron e assinalação das principais regiões funcionais	16
Figura 2. Representação gráfica de um néfron e assinalação dos processos de formação da urina realizados por cada região funcional	18
Figura 3. Esquema ilustrativo do processo de nucleação homogênea	20
Figura 4. Esquema ilustrativo do processo de nucleação heterogênea	21
Figura 5. Esquema ilustrativo do crescimento dos cristais	22
Figura 6. Representação gráfica da morfologia dos cristais de oxalato de cálcio monohidratado (A) e diidratado (B e C) quando formados na ausência de aditivos ou interferentes	23
Figura 7. Esquema ilustrativo da cadeia transportadora de elétrons representando as principais reações realizadas pelos complexos I, II, III e IV	25
Figura 8. Esquema gráfico ilustrativo da formação de um cálculo renal por meio de placa de Randall	29
Figura 9. Esquema gráfico ilustrativo da formação de um cálculo renal por meio de um plug de Randall.....	31
Figura 10. Estrutura clássica de fucoidans extraídos de algas marinhas marrons.....	36
Figura 11. Estrutura da xilofucoglucuronana (fucoidan) sulfatada da alga marrom <i>Spatoglossum schröderi</i> proposta por Leite et al. (1998)	37
Figura 12. Fotografia da alga <i>Dictiopterys delicatula</i> coletadas na praia de Pirambúzios/RN e utilizada nesse trabalho	43
Figura 13. Esquema ilustrativo representação o procedimento adotado para o fracionamento da porção solúvel do extraído na proteólise	46
Figura 14. Imagem da lâmina eletroforese contendo as frações cetônicas obtidas na extração/precipitação	61
Figura 15. Cristais de CaOx observados por microscopia óptica nos aumentos de 200x (imagem maior) e 600x (imagem menor)	63
Figura 16. CaOx observados por microscopia óptica nos aumentos de 600x Erro! Indicador não definido.	
Figura 17. Espectros de FTIR dos cristais CaOx formados na ausência de F0,5v (A), ou presença de 0,01 mg/mL (B), 0,02 mg/mL (C) e 0,10 mg/mL (D) de F0,5v. cm^{-1}	69
Figura 18. Gráfico representando o efeito da presença de F0.5v em diferentes concentrações nos valores de absorbância no decorrer do tempo.....	70

Figura 19. Percentual de redução do MTT das células MDCK após tratamento com diferentes concentrações de F0,5v por 24 h. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo	71
Figura 20. Percentual de redução do MTT das células MDCK após o tratamento profilático com diferentes concentrações de F0,5v e exposição ao H ₂ O ₂	72
Figura 21. Percentual de redução do MTT das MDCK após o tratamento com diferentes concentrações de F0,5v concomitante com a exposição ao H ₂ O ₂	73
Figura 22. Percentual de redução do MTT das células MDCK expostas ao H ₂ O ₂ e o tratamento regenerativo por adição de F0,5v em diferentes concentrações. Células expostas ao H ₂ O ₂ e não tratadas com F0,5v foram utilizadas como controle positivo.....	74
Figura 23. Gráfico exibindo os resultados da quantificação de cálcio no sobrenadante das soluções após o fim da cristalização	68
Figura 24. Representação gráfica dos valores de rendimento obtido nas diferentes subfrações de F0,5v após a cromatografia de troca iônica, bem como o rendimento total	75
Figura 25. Imagem da lâmina eletroforese contendo as subfrações obtidas pela cromatografia de troca iônica.....	78
Figura 26. Cromatograma obtido a partir da análise da F0,5v e suas subfrações por meio CLAE acoplada à um detector de índice de refração	79
Figura 27. Avaliação da capacidade antioxidante total da fração F0,5v e suas subfrações por meio da redução do molibdato	81
Figura 28. Percentual de sequestro dos radicais •OH pela presença da fração F0,5v e suas respectivas subfrações durante a produção <i>in vitro</i> da reação de Fenton.....	82
Figura 29. Percentual de radicais O ₂ ⁻ sequestrados devido à adição de F0,5v e suas subfrações	83
Figura 30. Percentual de radicais •NO sequestrados devido a presença da fração F0,5v e suas subfrações.....	84
Figura 31. Cristais de CaOx observados por microscopia óptica nos aumentos de 200x (imagem maior) e 400x (imagem menor)	85
Figura 32. Esquema representando o modelo de crescimento de Cabrera–Vermilyea	93

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Algumas atividades farmacológicas atribuídas a fucanas e fucoidans extraídos de algas marinhas marrons.....	38
Tabela 2 - Rendimentos do fracionamento com acetona do extrato bruto obtido a partir alga <i>D. delicatula</i> . Determinou-se tanto o rendimento relativo entre as frações como o rendimento em relação a massa de alga seca.....	59
Tabela 3 - Teor de açúcares, proteínas, compostos fenólicos e sulfato das frações obtidas pelo processo de extração proteolítica seguido de fracionamento por adição seriada de acetona.....	60
Tabela 4 - Razão molar e percentual entre os monossacarídeos presentes nas frações cetônicas.....	62
Tabela 5 . Dados referentes à contagem média e diferenciação dos cristais formados na ausência ou presença de cada uma das diferentes frações cetônicas.....	64
Tabela 6 - Médias e desvio padrão do potencial zeta dos cristais de CaOx formados na presença ou ausência de diferentes frações cetônicas na concentração de 0,10 mg/mL....	65
Tabela 7 - Dados referentes à contagem e diferenciação dos cristais formados na ausência ou presença de diferentes concentrações de F0,5v.	67
Tabela 8 - Composição química das frações obtidas a partir da F0,5v pelo processo cromatografia de troca-iônica e precipitação por adição de metanol.....	76
Tabela 9 - Razão molar e percentual entre os monossacarídeos presentes nas subfrações de F0,5v.....	77
Tabela 10 - Principais picos observados nos cromatogramas da F0,5v e suas subfrações e a estimativa de tamanho molecular referente a cada pico.....	80
Tabela 11 - Dados referentes à contagem e a diferenciação dos cristais formados na ausência ou presença da F0,5v ou uma das suas subfrações.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
AbsMax	Absorbância máxima
a.C	Antes de Cristo
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CaOx	Oxalato de cálcio
CAT	Capacidade antioxidante total
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetros
COD	Cristais de oxalato de cálcio diidratados
COM	Cristais de oxalato de cálcio monohidratados
COT	Cristais de oxalato de cálcio de trihidratados
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
FRPS	Fração rica em polissacarídeos sulfatados
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
g	Aceleração da gravidade
GAGs	Glicosaminoglicanos
GlcA	Ácido glucurônico
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
h	horas
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
kDa	Kilo Daltons
L	Litro
M	Molar
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Brometo de tetrazólio azul de tiazol
mV	Milivolt
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NBT	Azul de nitrotetrazólio
nm	Nanômetros
O₂[°]	Íon superóxido
OH[°]	Íon hidroxila
P. A	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
PS	Polissacarídeos sulfatados
RN	Rio Grande do Norte
SFB	Soro fetal bovino
SISGEN	Sistema nacional de gestão do patrimônio genético
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema único de saúde

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1. Epidemiologia da urolitíase.....	14
1.2. Fisiologia renal.....	15
1.2.1. Formação da urina.....	15
1.3. Composição dos cálculos renais.....	18
1.4. Formação dos cálculos renais de CaOx.....	19
1.4.1. A interação entre o oxalato e o cálcio para formar CaOx.....	19
1.4.2. Cristalização do oxalato de cálcio.....	19
1.4.3. Crescimento dos cristais de CaOx.....	21
1.4.4. Tipos de cristais de CaOx.....	23
1.5. Estresse oxidativo.....	24
1.5.1. Espécies reativas de oxigênio: Uma visão geral.....	24
1.6. Agentes antioxidantes.....	26
1.6.1. Antioxidantes exógenos orgânicos.....	27
1.6.2. Antioxidantes exógenos inorgânicos.....	28
1.7. Modelos para o surgimento dos cálculos renais de CaOx.....	28
1.7.1. Formação de cálculos a partir das placas de Randall.....	29
1.7.2. Formação de cálculos a partir dos plugs de Randall.....	30
1.8. Inibidores da formação de cálculos renais.....	32
1.8.1. Inibidores endógenos da formação de cálculos renais.....	32
1.8.2. Inibidores exógenos da formação de cálculos renais.....	33
1.9. Algas marinhas e seus polissacarídeos sulfatados: uma visão geral.....	34
1.9.1. Polissacarídeos sulfatados de algas marrons.....	35
1.10. Atividades farmacológicas das fucanas e fucoidans.....	37
1.11. <i>Dictyopterus delicatula</i>	40
2. Objetivos.....	42
2.1. Objetivo Geral.....	42
2.2. Objetivos específicos.....	42

3.	Materiais e métodos.....	42
3.1.	A alga <i>Dictyopteris delicatula</i>	42
3.2.	Linhagem de células	43
3.3.	Equipamentos.....	43
3.4.	Reagentes	44
3.5.	Coleta e limpeza da alga <i>Dictyopteris delicatula</i>	45
3.6.	Extração proteolítica e fracionamento dos componentes da alga <i>D. delicatula</i>	45
3.7.	Caracterização físico-química das frações cetônicas.....	47
3.7.1.	Dosagem de açúcares totais.....	47
3.7.2.	Dosagem de proteínas.....	47
3.7.3.	Dosagem de compostos fenólicos	48
3.7.4.	Dosagem de sulfato	48
3.7.5.	Eletroforese em gel de agarose e tampão PDA	49
3.7.6.	Determinação da composição monossacarídica das frações cetônicas.....	49
3.8.	Indução da cristalização do oxalato de cálcio para os diferentes ensaios realizados 50	
3.9.	Análise de microscopia óptica dos cristais CaOx	51
3.10.	Avaliação espectrofotométrica da cristalização de oxalato de cálcio	51
3.11.	Avaliação do potencial zeta dos cristais CaOx	52
3.12.	Subfracionamento da fração F0,5v por cromatografia de troca iônica	52
3.13.	Caracterização das subfrações de F0,5v.....	53
3.13.1.	Cromatografia líquida de exclusão molecular	53
3.14.	Quantificação de cálcio iônico	53
3.15.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	53
3.16.	Capacidade antioxidante total	53
3.17.	Sequestro de radicais hidroxila.....	54
3.18.	Sequestro de radicais superóxido	55
3.19.	Sequestro de óxido nítrico.....	55
3.20.	Cultivo celular.....	56

3.21.	Ensaio de redução do brometo de tetrazólio azul de tiazol (MTT) em células MDCK	56
3.21.1.	Avaliação da toxicidade da fração F0,5v em células MDCK	57
3.21.2.	Avaliação do potencial da F0,5v na mitigação do dano oxidativo em células MDCK	57
3.22.	Análise estatística	58
4.	Resultados	58
4.1.	Extração das frações cetônicas e o rendimento obtido	58
4.2.	Caracterização físico-química das frações cetônicas	59
4.2.1.	Determinação da composição química das frações cetônicas	59
4.2.2.	Eletroforese em gel de agarose das frações cetônicas	60
4.2.3.	Determinação da composição monossacarídica das frações cetônicas	61
4.3.	Análise de efeito modulador das diferentes frações cetônicas no processo de cristalização do oxalato de cálcio	62
4.4.	Análise do potencial zeta dos cristais de CaOx	65
4.5.	Análises por microscopia óptica do efeito modulador de cristalização de diferentes concentrações de F0,5v	66
4.6.	Análise dos cristais CaOx por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	68
4.7.	Avaliação individualizada da nucleação, da agregação e da sedimentação dos cristais CaOx	70
4.8.	Avaliação das alterações na capacidade de células MDCK reduzirem o MTT após tratamento com F0,5v	71
4.9.	Avaliação do potencial da F0,5v em mitigar os danos causados em célula MDCK expostas ao peróxido de hidrogênio	72
4.9.1.	Efeito profilático	72
4.9.2.	Efeito protetor	73
4.9.3.	Efeito regenerativo	74
4.10.	Quantificação do cálcio livre ao término da cristalização do CaOx	67
4.11.	Fracionamento da fração F0,5v por cromatografia de troca iônica	75
4.12.	Caracterização físico-química das subfrações de F0,5v	76

4.12.1.	Caracterização química das subfrações de F0,5v	76
4.12.2.	Determinação da composição monossacarídica das subfrações de F0,5v.	76
4.12.3.	Caracterização por eletroforese em gel de agarose das subfrações de F0,5v 77	
4.12.4.	Análise das subfrações de F0,5v por cromatografia líquida de exclusão por tamanho	78
4.13.	Avaliação do potencial antioxidante da F0,5v e das suas subfrações.....	80
4.13.1.	Capacidade antioxidante total (CAT)	80
4.13.2.	Sequestro de radicais hidroxila.....	81
4.13.3.	Sequestro de radicais superóxido	82
4.13.4.	Sequestro de óxido nítrico	83
4.14.	Análises do efeito modulador de cristalização da F0,5v e suas subfrações por microscopia óptica.....	84
5.	Discussão	86
6.	Conclusão.....	99
7.	Referências bibliográficas	100

1. Introdução

1.1. Epidemiologia da urolitíase

A urolitíase ou cálculo renal é uma doença presente em todo globo, de alta prevalência e caracterizada pela presença de um corpo sólido no trato urinário, o qual compromete o fluxo da urina e gerando dor ao indivíduo. Além disso, os indivíduos acometidos por cálculos renais têm, geralmente, um redução na produtividade e na qualidade de vida (Hyams e Matlaga, 2014; Patel *et al.*, 2017). Uma das primeiras descrições da urolitíase data da Grécia antiga e foi feita por Hipócrates (460-377 a.C.), o qual já inclusive propunha tratamentos que envolviam a remoção da pedra alojada na bexiga, por isso a urolitíase talvez seja a primeira doença que teve seu mecanismo descrito pela medicina (Tefekli e Cezayirli, 2013).

A prevalência da urolitíase varia entre populações de diferentes regiões, sendo de 7 a 13% na América do Norte, 5 a 9% na Europa e 1 a 5% na Ásia (Sorokin *et al.*, 2017). No Brasil, os casos diagnosticados de cálculos renais não são obrigatoriamente notificados e por isso há poucos dados disponíveis em relação a epidemiologia da urolitíase. Entretanto, como casos de internação em hospitais do SUS devem ser notificados quanto ao motivo pode-se inferir algumas estimativas a partir dos dados referentes a internações. Com relação a isso um estudo avaliou o impacto da urolitíase na população pela brasileira com base nos casos de internações hospitalares entre 1996 e 2010 que tiveram cálculos renais como causa primária e concluiu que houve quase 70 mil internações hospitalares deste tipo, as quais representaram 0,61% de todas as internações no SUS por ano e um custo direto de cerca de 0,22% de todo gasto com saúde pública no Brasil (Korkes, Silva II e Heilberg, 2011). Ou seja, além do impacto na saúde, há também o impacto financeiro dos custos associados com os tratamentos médicos e os não calculados com licenças e com a remoção do indivíduo do ambiente de trabalho, já que a urolitíase afeta principalmente indivíduos na idade ativa, 20 a 49 anos (Korkes, Silva II e Heilberg, 2011). A região nordeste em particular corresponde a 19,68% das internações, apesar de corresponder a 27,82% da população brasileira (Korkes, Silva II e Heilberg, 2011).

Como há uma relação entre a urolitíase e hábitos alimentares cada vez mais comuns, como maior ingestão de sal e menor ingestão de vegetais, há uma expectativa de aumento na incidência e prevalência dessa doença e estima-se que cerca de 12% de população mundial já teve ou terá cálculo renal em algum estágio da vida (Alelign e Petros, 2018).

Fatores ambientais interferem na incidência da urolitíase, em regiões mais quentes ocorre muita perda de água por transpiração e isso leva a uma menor diluição da urina, que resulta em maior incidência de cálculos renais (Monga, 2008; Romero, Akpinar e Assimos, 2010). Os hábitos alimentares da população também influenciam a incidência da urolitíase, as populações com alto consumo de sal e alimentos processados, a

chamada “*Western diet*”, são mais acometidas pela urolitíase, provavelmente devido, também, a menor diluição da urina (Afsar *et al.*, 2016; Sofia, Walter e Sanatorium, 2016). Como há expectativa para o aumento tanto da temperatura global, quanto do número de pessoas que fazem uso da “*Western diet*” espera-se um aumento da incidência da urolitíase no futuro próximo (Sofia, Walter e Sanatorium, 2016). A atuação em profissões que envolvem jornadas de trabalho que colocam o indivíduo exposto a altas temperaturas por períodos longos durante o dia, também são condições correlacionadas com a maior incidência de urolitíase (Tawatsupa *et al.*, 2012). Quanto a influência do sexo e da faixa etária, a incidência é maior em homens que em mulheres e em indivíduos na faixa etária de 20 a 49 anos (Korkes, Silva II e Heilberg, 2011; Sofia, Walter e Sanatorium, 2016).

1.2. Fisiologia renal

A compreensão acerca da fisiologia e anatomia renal e dos mecanismos de formação da urina são cruciais para o entendimento da natureza dos cálculos renais e como eles são formados. Os rins são órgãos de formato parecido com grãos de feijões, que desempenham funções de: equilíbrio ácido-base, hormonal e excretora. No texto a seguir será dado enfoque à função excretora dos rins, pois ela está relacionada com a formação de cálculos renais.

1.2.1. Formação da urina

A função renal mais bem conhecida é sem dúvidas filtração do sangue e formação da urina. A estrutura responsável pela formação da urina nos rins é chamada de néfron (Figura 1) e existem milhares deles em cada rim humano. Os néfrons são divididos em várias subdivisões microscópicas e com funções específicas, as quais estão relacionadas com as diferentes etapas da formação de cálculos renais (Guyton and Hall, 2017).

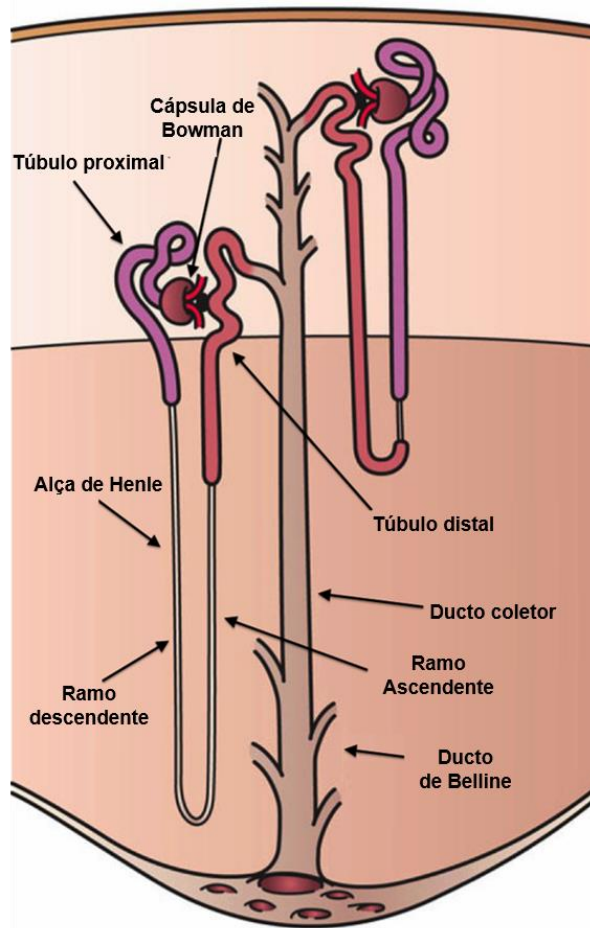


Figura 1. Representação gráfica de um néfron e assinalação das principais regiões funcionais. Fonte: Holly Fischer - <http://open.umich.edu/education/med/resources/second-look-series/materials> - Urinary Tract Slide 20, 26 e disponível em https://en.wikipedia.org/wiki/Nephron#/media/File:Kidney_Nephron.png e adaptada pelo autor, acessado no dia 27 de fevereiro de 2020.

A cápsula de Bowman é o local onde se inicia a formação da urina, ela compreende um envoltório em torno do glomérulo renal e é responsável pela filtração das moléculas maiores que 30 kDa, as quais não conseguem passar pela membrana e continuam no sangue, enquanto as moléculas pequenas como água, eletrólitos, aminoácidos e glicose têm passagem livre pela membrana e vão para as vias de excreção. O túbulo proximal desempenha a primeira etapa de concentração da urina, nessa região cerca de 70% dos eletrólitos e da água e a totalidade das moléculas orgânicas são reabsorvidas, exceto em caso de situações patológicas. O túbulo proximal também é responsável pela secreção de oxalato, uratos, sais biliares e fármacos. As porções seguintes do néfron são impermeáveis para as excretas, portanto, a quantidade de excretas presente nesta região será a mesma em todas as etapas da formação da urina (Guyton and Hall, 2017).

O volume de água que passa pela cápsula de Bowman é muito grande e a absorção nos túbulos proximais não é suficiente para evitar a grande perda de líquido e eletrólitos, por isso há um esforço maior para o reaproveitamento da água, que ocorre na alça de Henle (Guyton and Hall, 2017).

A alça de Henle é dividida em ramo descendente e ascendente: o ramo descendente é altamente permeável a água e o fluido intersticial nesta região é altamente concentrado, estas duas características garantem o fluxo de água da luz da alça para o espaço intersticial e, conseqüentemente, promovem a concentração da urina; o ramo descendente de Henle remove praticamente toda água excedente sem remover nenhum soluto, por isso, durante esta etapa tem-se o valor máximo de concentração da urina. A hiperconcentração da urina é fundamental para a formação de cálculos renais, pois é nesta etapa em que ocorre a formação dos cristais urinários de oxalato de cálcio, urato, ácido úrico, carbonato de cálcio e outros (Guyton and Hall, 2017).

O ramo ascendente da alça de Henle é impermeável a água e nesta região atuam transportadores ativos de eletrólitos, principalmente de sódio e potássio, que realizam a reabsorção destes íons. A reabsorção de íons reduz a concentração osmótica do ultrafiltrado, porém a redução na concentração não é capaz de dissolver cristais que porventura tenham se formado anteriormente, o que faz com haja um fluxo constante de cristal para a próxima microrregião do néfron: os ductos coletores (Guyton and Hall, 2017).

O túbulo distal e o ducto coletor atuam regulando a concentração da urina, nesta região, pode ocorrer a secreção ou reabsorção de água, sódio, potássio, cálcio, íons H⁺ e cloro. É nessa etapa da formação da urina que, a partir das regulações hormonais, o corpo determina a concentração e pH final da urina, as duas regiões citadas são altamente reguladas por hormônios: o túbulo distal é regulado pelos mineralocorticoides e o ducto coletor pela vasopressina. O ducto de Bellini não possui grande relevância fisiológica, porém sua participação é crucial no desenvolvimento de cálculos renais, note na Figura 1 que o ducto de Bellini é a última região microscópica por onde flui a urina antes de chegar ao cálice renal, e por isso é o limite anatômico para que uma determinada partícula fique retida ou não nos néfrons (Guyton and Hall, 2017).

Conhecer o processo de formação da urina e os eventos de aumento e redução na concentração é fundamental para compreender a formação dos cálculos renais, por isso com o objetivo de facilitar a compreensão do leitor a respeito do tema, as etapas de maior relevância para a formação de cálculos renais estão representadas de forma esquematizada (Figura 2) (Guyton and Hall, 2017).

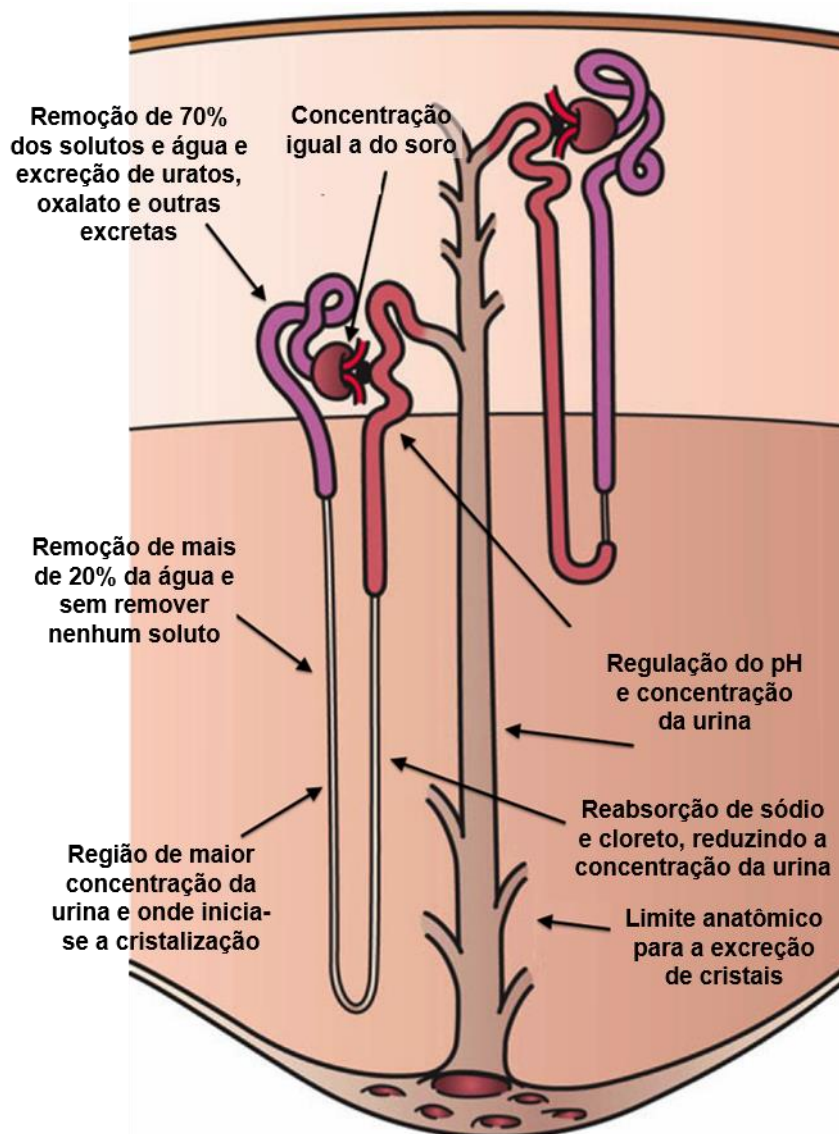


Figura 2. Representação gráfica de um néfron e assinalação dos processos de formação da urina realizados por cada região funcional. Fonte: Holly Fischer - <http://open.umich.edu/education/med/resources/second-look-series/materials> - Urinary Tract Slide 20, 26 e disponível em https://en.wikipedia.org/wiki/Nephron#/media/File:Kidney_Nephron.png e adaptada pelo autor, acessado no dia 27 de fevereiro de 2020.

1.3. Composição dos cálculos renais

Como citado anteriormente, cálculo renal é um termo que se refere à presença de um corpo sólido no sistema urinário, e que, portanto, não faz distinção quanto à natureza química deste corpo. A composição dos cálculos renais é bastante variada e inclui a participação de compostos inorgânicos e orgânicos. Vale salientar que compostos inorgânicos são de longe os principais componentes dos cálculos renais, sendo os três principais formadores de cálculos: o oxalato de cálcio, a junção de ácido úrico e fosfato de cálcio e a estruvita. Proteínas ou aminoácidos como a cistina também podem formar cálculos, mas a ocorrência deste tipo de cálculo é mais rara e geralmente só acontece quando associada à condições

fisiológicas preexistentes, como distúrbios da reabsorção nos túbulos proximais (Woodard *et al.*, 2019).

Dentre os cálculos inorgânicos o tipo de cálculo mais comum é aquele formado majoritariamente por oxalato de cálcio (CaOx). Cálculos formados por CaOx ocorrem em 75% dos casos de urolitíase, seguido pelos cálculos de estruvita, ácido úrico e cistina, os quais ocorrem em 10-15%, 3-10% e 2% dos casos, respectivamente (Aggarwal *et al.*, 2013).

Os cálculos de estruvita estão associados às infecções urinária por bactérias produtoras de urease, como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*, e os cálculos renais de cistina estão associados a uma desordem na capacidade dos túbulos proximais em reabsorver a cistina, o que leva a cistinúria e à formação do cálculo de cistina (Alelign e Petros, 2018). Já os mecanismos de formação dos cálculos de ácido úrico e de CaOx ainda não foram completamente elucidados, porém há hipóteses e modelos que tentam descrever a formação destes cálculos. Como estes são o objeto de estudo deste trabalho será dado enfoque a formação dos cálculos de CaOx.

1.4. Formação dos cálculos renais de CaOx

Antes de compreender a formação dos cálculos renais de CaOx é preciso discorrer, mesmo que sucintamente, a respeito de dois temas: o primeiro é o processo termodinâmico da cristalização e o segundo é o estresse oxidativo fisiológico ao qual as células renais estão expostas.

1.4.1. A interação entre o oxalato e o cálcio para formar CaOx

A associação de íons oxalato com cálcio é muito favorável, por isso, quando os dois estão presentes na solução a maior parte é convertida em CaOx (Ratkalkar e Kleinman, 2011; Riley *et al.*, 2013). O CaOx é um sal de baixíssima solubilidade em água, apenas 0,67 mg/L a 20 °C, considerando que indivíduos saudáveis apresentam em média excreção de 18,6 mg/dia de oxalato (Waikar *et al.*, 2019), e que produzam dois litros de urina por dia (limite superior da faixa de normalidade) a concentração de oxalato na urina desses indivíduos será de 9,3 mg/L, considerando que quase todo oxalato presente na urina é convertido a CaOx (Ruiz-Agudo *et al.*, 2017), o indivíduo normal terá uma concentração de CaOx muito superior ao limite de saturação do CaOx, com isso conclui-se que mesmo indivíduos normais apresentam formação de cristais de CaOx na urina.

1.4.2. Cristalização do oxalato de cálcio

A cristalização é um processo termoquímico onde há dois sistemas possíveis: ionização e cristalização. A principal força que rege a cristalização é a concentração, com o aumento da concentração a ionização dos sais se torna cada vez mais desfavorável

energeticamente, até que se cruza o limite da solubilidade, a partir deste ponto a cristalização passa a ser mais energeticamente favorável (Sear, 2007).

Há três etapas na cristalização: a nucleação, o crescimento e a agregação, as quais ocorrem nessa ordem respectivamente. A nucleação corresponde ao momento em que os íons deixam de se mover livremente na solução e passam a ter organização. A nucleação pode ser homogênea ou heterogênea, para fins de melhor compreensão iniciar-se-á a explicação pela nucleação homogênea (Sear, 2007).

A nucleação homogênea geralmente é teórica, pois só ocorre em sistemas sem contaminantes ou agentes externos e isso é quase impossível na prática, principalmente em sistemas biológicos. A nucleação homogênea ocorre quando a concentração do sal supera o limite de solubilidade e quebra a barreira energética para a cristalização, com isso os íons dispersos começam a interagir entre si.

Para fins de melhorar compreensão acerca da nucleação homogênea ela será dividida em três momentos (Figura 3). Inicialmente há uma solução salina com concentração abaixo do limite de saturação (Figura 3A), posteriormente, essa solução torna-se supersaturada e o íons contido nela tende a interagir mais entre si (Figura 3B), quando a interação entre os íons se torna forte o suficiente para superar camada de solvatação, eles passam a formar ligações iônicas entre si, as quais definem o momento em que os íons agregados passam a ser cristais (Figura 3C). Em termos gerais, a nucleação homogênea não tem contaminantes e é guiada apenas pela supersaturação e os íons “realizam sozinhos” a cristalização (Abdel-Aal, Yassin e El-Shahat, 2018).

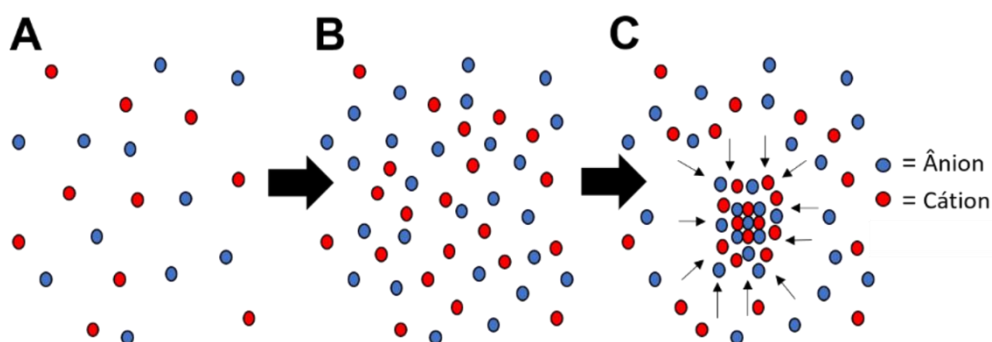


Figura 3. Esquema ilustrativo do processo de nucleação homogênea. Solução abaixo do limite de saturação (A) conforme se torna mais concentrada é transformada em solução supersaturada (B), a partir deste pontos se torna mais favorável energeticamente a interação entre os íons cálcio e oxalato e com isso tem início a agregação de íons para formação de cristais (C). Fonte: Autoria própria

A cristalização heterogênea é mais frequente e bem mais complexa, pois leva em consideração a superfície de contato com a solução e possíveis contaminantes. A nucleação heterogênea também depende da supersaturação, porém conta com agentes que funcionam como “catalisadores” da nucleação, de forma que ela é mais acelerada e pode ocorrer, em tempo hábil, em situações de saturações de sais onde a nucleação homogênea demoraria dias.

Assim como a homogênea, a nucleação heterogênea também será dividida em três momentos (Figura 4). Primeiro uma solução salina abaixo da saturação (Figura 4A) se torna supersaturada (Figura 4B), depois uma superfície ou corpo sólido, geralmente carregado, atua organizando uma camada de íons, cátions ou ânions, essa camada de íons recém-formada favorece a deposição de uma outra camada iônica de carga oposta e assim sucessivamente (Figura 4C). Portanto, a presença de um componente sólido facilita a imobilização e organização dos íons para a formação dos cristais, atuando de forma semelhante a um catalisador. Contudo, a nucleação heterogênea não é influenciada só pela supersaturação do sal, mas também pela carga e a morfologia do agente agregador (Khan *et al.*, 2016).

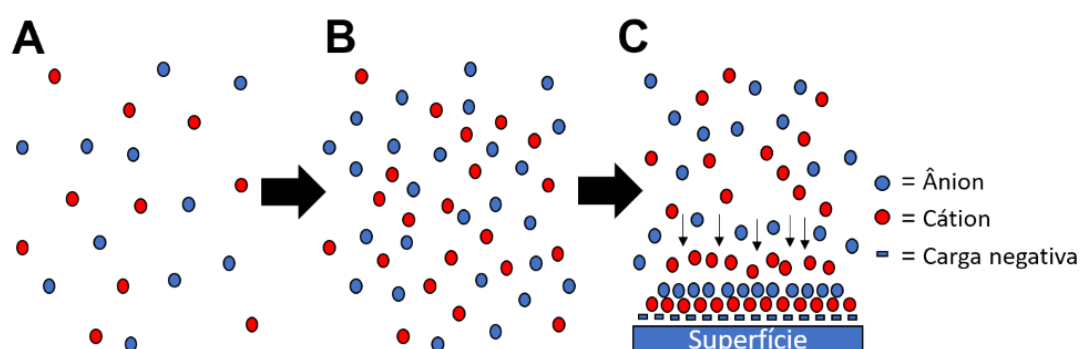


Figura 4. Esquema ilustrativo do processo de nucleação heterogênea. Uma solução abaixo do limite de saturação (A) torna-se cada vez mais concentrada até que não há mais água suficiente para permitir a total dispersão dos íons e esses passam a interagir mais entre si e com outros componentes da solução (B), quando a interação com a superfície de uma partícula carregada dispersa na solução é grande o suficiente para superar a camada de solvatação, inicia-se uma agregação organizada de íons sob a superfície da partícula que leva a formação de um cristal (C). Fonte: Autoria própria.

1.4.3. Crescimento dos cristais de CaOx

Ao contrário dos seres vivos, que crescem “de dentro para fora”, os cristais crescem pela adsorção de novos íons na sua superfície, ou seja, “de fora para dentro”. Ainda correlacionado com seres vivos, esses crescem pela aquisição de nutrientes, enquanto os cristais crescem pela aquisição de íons. Essa analogia, apesar de incorreta frente ao rigor científico, ajuda a compreender o motivo pelo qual o principal determinante da cristalização é a supersaturação do sal a ser cristalizado. Outra característica importante do crescimento dos cristais que ele ocorre nas mesmas velocidades em todas as direções, o que é chamado de crescimento isotrópico, porém, quando há presença de contaminantes durante cristalização, podem ocorrer alterações na velocidade do crescimento entre as faces dos cristais, ou seja um crescimento anisotrópico. Na Figura 5A é mostrado esquematicamente este crescimento, já nas figuras B e C são mostrados exemplos esquemáticos de crescimentos anisotrópicos de um cristal hipotético.

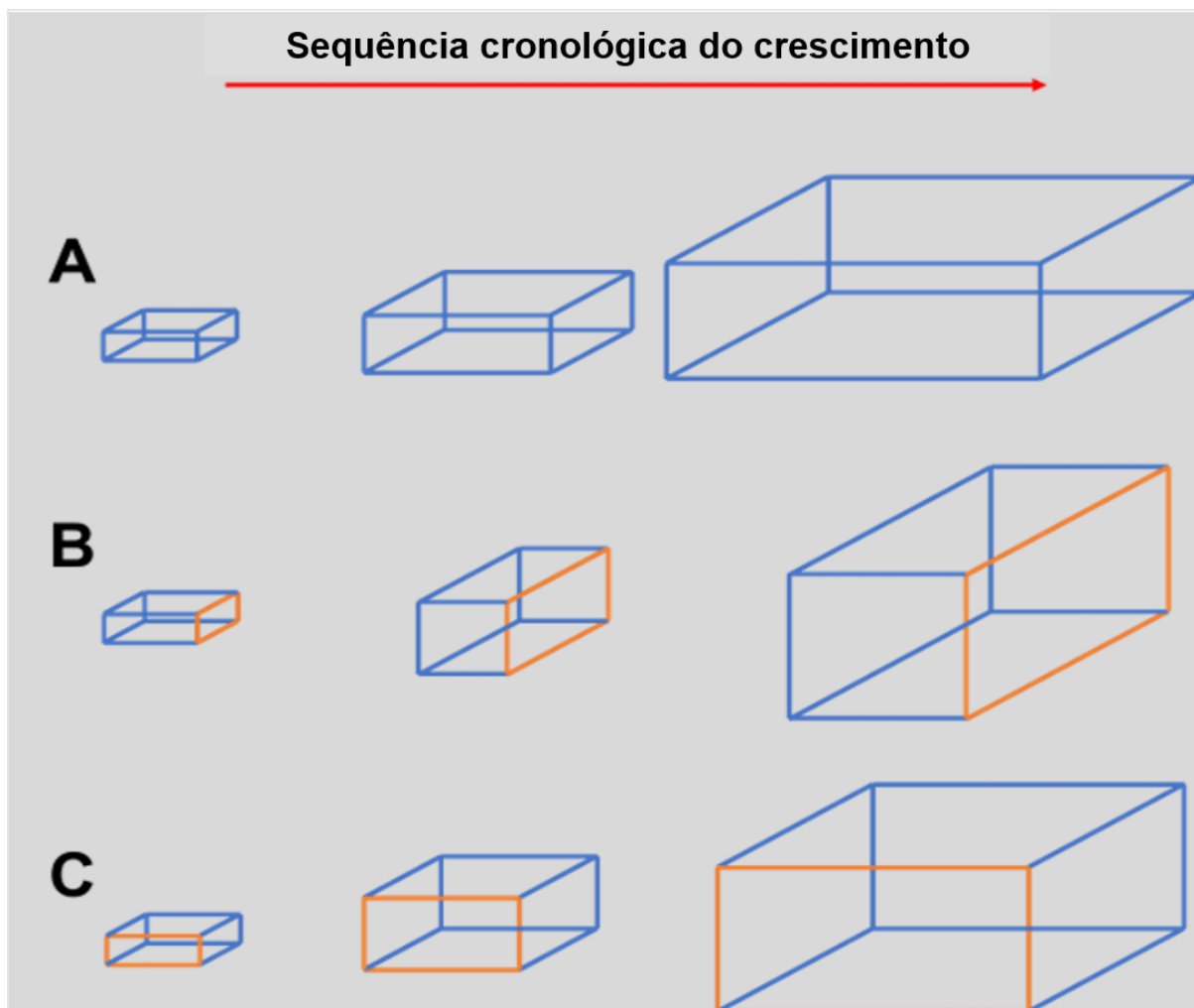


Figura 5. Esquema ilustrativo do crescimento dos cristais. O crescimento isotrópico mantém as proporções entre as diferentes faces (A). A adsorção de interferentes numa das faces (linhas alaranjadas) impede a adsorção de novos íons e modifica as proporções do cristal ao final do crescimento (B e C). Fonte: Autoria própria

Como resultado do crescimento isotrópico todos os cristais apresentam-se proporcionalmente iguais em relação as suas dimensões (largura, altura e comprimento) independente do seu tamanho total. Por exemplo, um cristal de cloreto de sódio é um cubo, mesmo que esse tenha nanômetros ou milímetros de comprimento (Borchardt-Ott, 2012).

A isotropia no crescimento dos cristais é muito útil para estudar moduladores, pois interferências na isotropia do cristal podem ser facilmente observadas e relacionadas com os diferentes interferentes. Os moduladores do crescimento se adsorvem em uma das faces e impedem a adsorção de novos íons na mesma região, com isso impedem o crescimento dessa face, a qual ao final do processo de crescimento fica alargada em relação às outras faces (Figura 5B e %C) (Borchardt-Ott, 2012).

Conforme apresentado na Figura 5, a estrutura final do cristal revela a região onde o modulador ligou-se e com isso é possível definir em qual face o inibidor do crescimento se adsorve (Borchardt-Ott, 2012).

1.4.4. Tipos de cristais de CaOx

A cristalização do oxalato de cálcio pode formar três tipos distintos de cristais, que são classificadas pelo respectivo grau de hidratação, são eles: os monohidratados (COM); os dihidratados (COD); e os trihidratados. Os cristais CaOx relevantes para a medicina são os COM e os COD, pois são encontrados em cálculos renais e na urina de seres humanos (Daudon *et al.*, 2004).

Apesar de serem classificados pelo grau de hidratação, os COM e COD são diferentes também quanto a outras características, como na estrutura cristalina e nas faces dos cristais. Todas as diferenças estão relacionadas à distribuição dos ânions e cátions e a distância entre eles, a interferem principalmente na forma com que os cristais interagem entre si, com moléculas distinta, inclusive inibidores, e com as células renais (Christmas *et al.*, 2002; Izatulina *et al.*, 2018; Sheng, Ward e Wesson, 2005). As características dos COM conferem a ele maior propensão de aderi e causar dano ao epitélio renal (Sun *et al.*, 2015) e de formar agregados que ficam retidos no trato urinário, por isso os COM estão mais associados com o desenvolvimento de cálculos renais (Vinaiphat *et al.*, 2017).

Quando formados na ausência de aditivos os COM tendem a apresentarem uma forma retangular e com pontas (Figura 6A), apresentando três diferentes tipos de faces: (121), (100) e (010) (Grohe *et al.*, 2007), enquanto os cristais COD tendem a apresentarem-se com morfologia bipiradimal (Figura 6B e 6C), apresentando apenas dois tipos de faces: (100) e (101) (Thomas *et al.*, 2012).

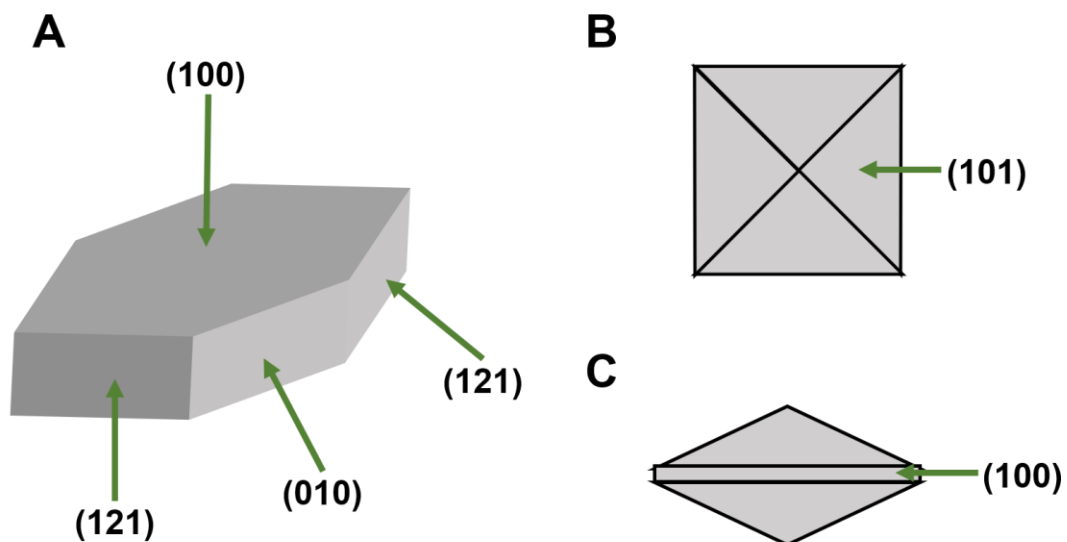


Figura 6. Representação gráfica da morfologia dos cristais de oxalato de cálcio mono-hidratado (A) e dihidratado (B e C) quando formados na ausência de aditivos ou interferentes. O cristal dihidratado está expresso em uma vista superior (B) e lateral (C), para facilitar o entendimento, e o cristal mono-hidratado está numa vista em perspectiva (A). Os números em parentes são referentes à numeração das respectivas faces apontados pelas setas, essa numeração é comumente adotada na cristalografia. Fonte: Autoria própria

Segundo Christmas *et al.* (2002) a diversas superfícies planas dos cristais COM facilitaria a sua maior interação física entre si e, por conseguinte, a maior capacidade desses formarem agregados, enquanto os cristais COD possuem morfologia que desfavorece o seu “empilhamento”.

Como dito anteriormente, a formação de cristais de CaOx na urina não é particularidade dos indivíduos acometidos por cálculos renais, porém a retenção e adesão desses cristais no trato urinário é. A lesão previa do epitélio renal devido ao estresse oxidativo é apontado como um dos fatores responsáveis pela retenção e adesão de cristais, e consequentemente formação de cálculos renais.

1.5. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo corresponde ao dano a nível molecular causado pela presença de agentes reativos, geralmente derivados no oxigênio, que reagem de forma inespecíficas com macromoléculas e comprometem suas funções. O estresse oxidativo é um elemento atuante no desenvolvimento de diversas doenças e é geralmente descrito com o um desbalanço entre os a produção de espécies reativas e os mecanismos antioxidante.

Uma etapa crucial para a formação de cálculos renais é a lesão do epitélio renal e a consequente exposição da camada de colágeno subjacente, sendo o principal agente lesivo o estresse oxidativo (Daudon, Bazin e Letavernier, 2014). Células epiteliais renais ao serem expostas ao oxalato tornam-se mais “adesivas” aos cristais de CaOx e isso favorece a formação de cálculos, porém na presença de antioxidantes este efeito não ocorre (Kanlaya, Singht e Thongboonkerd, 2016). Camundongos recebendo chá verde e tratados com injeções intra-abdominais de glioxilato, o qual promove a formação de cálculos renais de CaOx, formam menos depósitos de CaOx nos rins do que camundongos que não receberam nenhum antioxidante (Hirose *et al.*, 2010), esses exemplos ajudam a confirmar o papel do estresse oxidativo na urolitíase.

O estresse oxidativo, no caso dos humanos, surge do uso do oxigênio. A utilização desse elemento nos processos metabólicos como a respiração celular apresenta uma vantagem evolutiva, pois proporciona um mecanismo eficiente para a geração de energia, porém como o oxigênio é um elemento altamente reativo, o envolvimento dele dentro do sistema biológico em reações de oxirredução podem levar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez geram o estresse oxidativo.

1.5.1. Espécies reativas de oxigênio: Uma visão geral

Espécies reativas de oxigênio são compostos caracterizado por serem capaz de reagir facilmente e de forma inespecífica com diferentes componentes celulares (lipídeos, proteínas,

carboidratos e ácidos nucleicos), normalmente os EROs possuem um elétron desemparelhado, entretanto essa regra não é geral (Pisoschi e Pop, 2015).

Os EROs podem ser formados em decorrência de fatores físicos ou biológicos, sendo o primeiro basicamente decorrente da ação da radiação ionizantes (Zmyślony e Pawlaczyk-Łuszczynska, 2003), enquanto os fatores biológicos se dividem em três fontes: a cadeia transportadora de elétrons (CTE); ação enzimática; e metabolização de agentes químicos e tóxicos.

O oxigênio molecular (O_2) não é capaz de gerar estresse oxidativo e precisa sofrer alguns processos para se tornar um composto reativo. O principal processo gerador de EROs é a CTE. Durante a CTE (Figura 7), os complexos enzimáticos I, II e III removem íons H^+ e elétrons dos compostos NADH e FADH e transportam os H^+ e os elétrons para a região intermembrana, depois o complexo IV transporta quatro elétrons do espaço intermembrana para reduzir o O_2 na matriz mitocondrial, formando duas moléculas de água (H_2O) e deixando apenas os íons H^+ no espaço intermembrana.

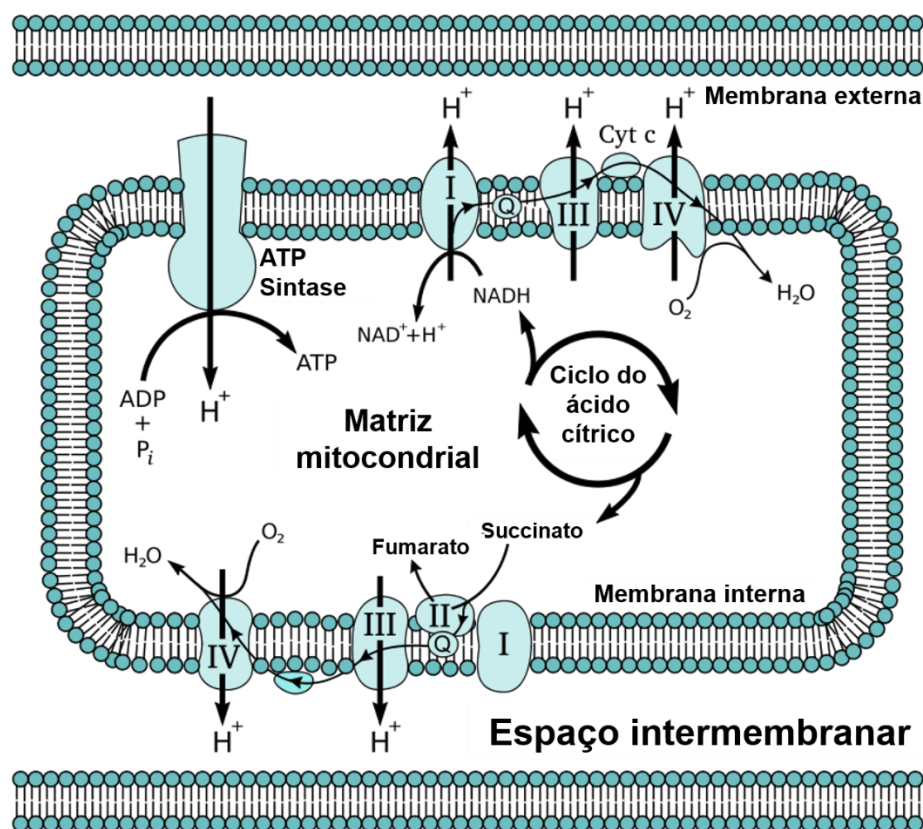


Figura 7. Cadeia transportadora de elétrons representando as principais reações realizadas pelos complexos I, II, III e IV. A geração de espécies reativas ocorre por falhas no complexo IV, o qual transporta elétrons para o oxigênio. Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_transport_chain#/media/File:Mitochondrial_electron_transport_chain—Etc4.svg e adaptada pelo autor. Acessado no dia 27 de fevereiro de 2020.

Infelizmente, o transporte de elétrons para o oxigênio nem sempre ocorre de forma correta e podem ocorrer três tipos diferentes de erros, todos eles relacionados com o

transporte incompleto de elétrons para o oxigênio no complexo IV ou “vazamento” de elétrons do complexo III diretamente para o oxigênio. O primeiro tipo de erro é transporte de apenas um elétron para o oxigênio, o qual gera radicais superóxido (O_2^\bullet), o segundo tipo é o transporte de apenas dois elétrons para o oxigênio que gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o terceiro e último tipo é o transporte de três elétrons para o oxigênio, o qual gera radicais hidroxila (OH^\bullet). Os erros mais comuns durante a CTE são os que geram radicais superóxido ou peróxido de hidrogênio (Zhao *et al.*, 2019).

A reação de Fenton é uma etapa crucial da geração do estresse oxidativo e consiste na atuação de um metal de transição (geralmente ferro ou cobre) na forma bivalente (2^+) como catalizador de uma série de reações que convertem o peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila, como os radicais hidroxila são muito mais tóxicos que o peróxido de hidrogênio, a reação de Fenton representa uma etapa importante no estresse oxidativo (Winterbourn, Kettle e Hampton, 2016).

Apesar dos efeitos tóxicos relacionados aos EROs, eles também desempenham funções fisiológicas. A formação enzimática “proposital” de EROs dá-se, majoritariamente, pela ação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). A NADPH oxidase atua gerando radicais superóxido por meio da seguinte reação química (Tarafdar e Pula, 2018; Winterbourn, Kettle e Hampton, 2016).



A atuação da NADPH oxidase ocorre principalmente em processos referentes ao sistema imune, sobretudo no processo de degradação dos corpos fagocitados por neutrófilos (Winterbourn, Kettle e Hampton, 2016).

Alguns compostos tóxicos precisam ser metabolizados para serem excretados pelo organismo e muitas vezes a metabolização desses químicos requer a produção de EROs, já que o corpo não dispõe de enzimas específicas para as mais diversas gamas de compostos químicos que podem porventura entrar no organismo (Mena, Ortega e Estrela, 2009).

A radiação ionizante também é geradora de EROs. A incidência da radiação remove ou adiciona elétrons e/ou hidrogênios à molécula de água o promove a quebra da molécula de água a partir da ação de radiação ionizante, radiólise, e resulta na formação de diversas EROs. (Zmyślony e Pawlaczyk-Łuszczynska, 2003).

1.6. Agentes antioxidantes

Uma das formas que os organismos têm de combater o estresse oxidativo é usar antioxidantes, sejam eles endógenos ou exógenos. Os antioxidantes são considerados compostos que são capazes de impedir ou mitigar o estresse oxidativo. Existem três mecanismos de ação antioxidante: atuando diretamente nos EROs gerados, impedindo

processos de geração de EROs como a inflamação e reação de Fenton ou atuando como cofator de outros antioxidantes (Birben *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2014).

Um dos mecanismos pelo qual os antioxidantes podem atuar é doando um elétron ao diretamente aos EROs, e com isso e neutralizá-los, e assim evitam a propagação das reações de oxirredução. Antioxidantes que atuam por esse mecanismo são considerados terminadores (Sharma, Gupta e Sharma, 2018).

Antioxidantes podem atuar também prevenindo a formação dos EROs, esse é o caso das proteínas ferritina, transferrina e ceruloplasmina, as duas primeiras servem como quelantes dos íons ferro e a última como quelante de íons de cobre, tanto o ferro como o cobre são capazes de realizar a, já citada, reação de Fenton se estiverem livres, por isso a retenção desses metais no interior dessas proteínas funciona com um mecanismo antioxidante, pois evita a reação de Fenton. Esse tipo de antioxidante é considerado preventor (Sharma, Gupta e Sharma, 2018).

Há ainda uma última classe de antioxidantes, essa classe é formada por moléculas atuam como cofator, estimulando a produção de algum outro antioxidante ou evitando a geração espontânea de antioxidantes pela NADPH oxidase, esse é caso de agentes anti-inflamatórios, que evitam a ativação exacerbada do sistema imune a geração de EROs pelos neutrófilos (Tarafdar e Pula, 2018).

Além da classificação com base no mecanismo de atuação, os antioxidantes podem ser classificados pela sua origem, se são produzidos pelo próprio organismo em que atuam, endógenos, ou pela aquisição na dieta, exógenos.

Os antioxidantes endógenos surgiram evolutivamente do desenvolvimento diversos aparatos para reduzir esse estresse, esses aparatos tornaram possível, em algum nível, a vida multicelular e em períodos de vidas prolongados, como os que se têm hoje no ambiente (Birben *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2014). A maior parte desse tipo de antioxidantes são enzimas, este é o caso da superóxido dismutase (Antonyuk *et al.*, 2009) e de catalase (Poprac *et al.*, 2017). Uma exceção aos antioxidantes enzimáticos é a glutathiona reduzida. O mecanismo antioxidante que envolve a glutathiona é complexo se comparado a SOD e a catalase (Poprac *et al.*, 2017) e requer maiores detalhamentos que fogem o objetivo dessa dissertação.

Compreende-se como antioxidantes exógenos aqueles que não são sintetizados pelo organismo e são obtidos através da dieta. Essa classe de antioxidantes pode ser subdivida entre antioxidantes orgânicos ou inorgânicos.

1.6.1. Antioxidantes exógenos orgânicos

Os vegetais são a principal fonte de antioxidantes exógenos para os seres humanos. Isso ocorre porque os vegetais são organismos expostos ao sol e agentes ambientes

demasiadamente e em resposta ao estresse constante, os vegetais produzem um grande volume de moléculas antioxidantes, ao adicionar na dieta vegetais os seres humanos absorvem esses compostos e estes funcionam como antioxidantes no organismo humano. A ingestão de antioxidantes exógenos é bastante benéfica ao organismo, pois previne o surgimento de doenças crônicas e aumenta a expectativa de vida (Pisoschi e Pop, 2015). Um exemplo de antioxidante exógeno essencial na dieta é o alfa-tocoferol (vitamina E), esse composto está presente em óleos vegetais e desempenha função de preservação da integridade para a membrana por interromper a peroxidação lipídica (Ayala, Muñoz e Argüelles, 2006).

Além da vitamina E, pode-se citar diversos antioxidantes e classes de antioxidantes provenientes de vegetais como: ácido gálico, vitamina C, vitamina A, carotenóides, polifenóis e etc. (KOCYIGIT e SELEK, 2016).

1.6.2. Antioxidantes exógenos inorgânicos

Conforme já relatado nesta dissertação, nem sempre as moléculas consideradas como antioxidantes atuam diretamente na neutralização de EROs. A ação antioxidante pode dar-se também por meio de cofatores e é nessa classe que se enquadram os antioxidantes inorgânicos. Os antioxidantes inorgânicos também são exógenos e precisam ser obtidos através das dietas, são eles: manganês, selênio e zinco. O manganês e o zinco são cofatores de diferentes tipos de SOD (Antonyuk *et al.*, 2009; Borgstahl *et al.*, 1992; Tainer *et al.*, 1983) e o selênio é cofator da glutathione peroxidase (Epp, Ladenstein e Wendel, 1983; Socha *et al.*, 2014).

1.7. Modelos para o surgimento dos cálculos renais de CaOx

Agora que já foi dissertado brevemente sobre os três principais temas que envolvem a formação de cálculos renais, será dissertado neste tópico a respeito dos principais modelos que descrevem a formação de cálculos renais de CaOx e as evidências que os fundamentam.

A cristalização de CaOx, o estresse oxidativo e a fisiologia renal da formação da urina são eventos que combinados entre si explicam a formação dos cálculos renais, porém o início da formação do cálculo, ou seja, o momento e o motivo pelo qual cristais pequenos ficam retidos nos rins, é a maior incógnita no processo da formação de cálculos renais.

A tentativa mais antiga conhecida, por isso tida como a primeira a elucidar esse processo, foi desenvolvida por Randall, nefrologista russo, em 1936. Randall observou vários cálculos renais de CaOx extraídos de paciente e notou uma estrutura em comum entre eles, um pequeno núcleo formado de fosfato de cálcio (Daudon, Bazin e Letavernier, 2014), e como já foi dito anteriormente, os cristais e os cálculos crescem pela deposição de material na sua superfície, portanto é esperado que na região central esteja a porção inicial dos cálculos, esse

achado levou Randall e seu grupo a propor que este pequeno núcleo de fosfato, que hoje é chamado de placa de Randall, seria o início do cálculo renal (Evan *et al.*, 2014).

A hipótese de Randall foi desconsiderada por muitos anos até retornar recentemente a ocupar espaço relevante nos estudos a respeito da formação de cálculos renais (Evan *et al.*, 2003). Hoje a teoria da formação de cálculos renais a partir das placas de Randall é bastante aceita e estudos posteriores conseguiram traçar um mecanismo para a formação de cálculos CaOx (Khan *et al.*, 2016) a partir da placa de Randall que será exposto a seguir.

1.7.1. Formação de cálculos a partir das placas de Randall

As placas de Randall são formadas entre o ramo descendente e o ramo ascendente das alças de Henle (Figura 8). Devido a fisiologia renal essa região é notável por ter a maior concentração iônica de todo o néfron, sendo por isso constante exposta a estresse. A primeira etapa da formação da placa de Randall (Figura 8B) é o dano ao epitélio renal pelo estresse oxidativo. A lesão no epitélio renal expõe o colágeno do espaço intersticial, o colágeno é uma “malha” carregada negativa e favorece a deposição de íons de cálcio e posteriormente fosfato, iniciando a nucleação heterógena e calcificação da região (Figura 8C).

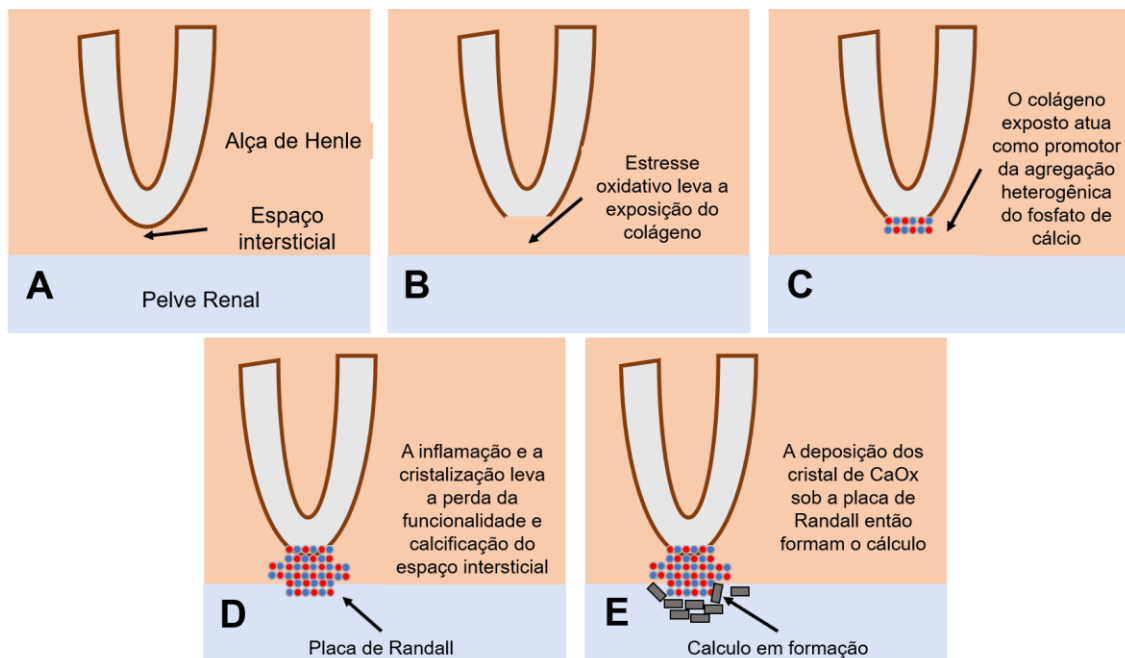


Figura 8. Esquema gráfico ilustrativo da formação de um cálculo renal por meio de placa de Randall. As bolinhas vermelhas e azul representam os íons de cálcio e fosfato, respectivamente, e os retângulos cinzas representam cristais de CaOx. Região entre os ramos ascendentes e descendente da alça de Henle, onde se formam as placas de Randall (A). Estresse oxidativo causando danos ao epitélio renal (B). Agregação heterogênea de fosfato de cálcio induzida pela exposição do colágeno (C). Inflamação e estresse oxidativo levam a calcificação do espaço intersticial e formação da placa de Randall, que se expõe para a pelve renal (D). Agregação de cristais CaOx, geralmente mono-hidratados, já formados sob a placa de Randall, dando início a formação do cálculo propriamente dito (E). Fonte: Autoria própria

A presença do fosfato de cálcio e a continuidade do estresse oxidativo levam a inflamação e calcificação do interstício, um processo similar à calcificação vascular que ocorre na arteriosclerose. O interstício calcificado entre a alça de Henle e pelve renal é placa de

Randall (Figura 8D). A placa de Randall formada serve como “âncora” para cristais de CaOx que passam a se acumular, iniciando assim a formação do cálculo propriamente dito (Figura 8). Dão suporte a este modelo os achados que apontam para o papel relevante de genes (Bird e Khan, 2017), proteínas e processos ligados a osteogênese (Convento *et al.*, 2017) no desenvolvimento de cálculos renais (Gambaro *et al.*, 2004).

Como pode ser notado o mecanismo de formação dos cálculos renais a partir das placas de Randall é bem elucidado, porém as placas de Randall estão associadas apenas à 34,1% dos cálculos renais de CaOx (Letavernier *et al.*, 2015).

Mesmo assim, os mecanismos descobertos no desenvolvimento de cálculos CaOx a partir das placas de Randall como: nucleação heterogênea e calcificação na região subepitelial servem como base para todos os outros modelos de desenvolvimento de cálculos renais.

1.7.2. Formação de cálculos a partir dos plugs de Randall

O modelo de plug de Randall ou também chamado de “partículas livres” propõem um mecanismo de diferente para a formação dos cálculos renais. Assim como as placas de Randall esse modelo também se sustenta em achados nos cálculos renais de CaOx retirados de pacientes, porém ao contrário de placas aqui são encontrados “plugs”, porções de fosfato de cálcio alongadas com morfologia muito semelhante a ductos coletores. A partir desses achados se propôs então a possibilidade dos cálculos se formarem a partir da retenção de partículas nos ductos coletores, ou mais precisamente nos ductos de Belline (Figura 9).

Nos ductos coletores ocorre a maior supersaturação em relação a oxalato de cálcio de todo o néfron, além disso o mesmo ducto coletor “serve” para mais um néfron e por isso muitos cristais passam por ele, pôr fim a porção terminal do ducto coletor (ducto de Belline) tem uma estrutura semelhante a uma fenda e é mais estreita que a luz das outras regiões do ducto (Figura 9A).

No modelo de plugs de Randall os cristais precisariam ter um crescimento numa velocidade que dentro dos padrões da formação da urina é impossível, por esse motivo esse modelo foi inicialmente considerado como inviável (Finlayson, 1978), já que o tempo necessário para atingir o tamanho crucial era maior que o tempo em que os cristais realizavam o trajeto até o cálice renal. Porém, ao considerar os fatores mecânicos como: gravidade, atrito com a parede dos ductos coletores e possibilidade de agregação de cristais Robertson em 2014 demonstrou, por meio de modelo matemático, que é possível a formação de cristais grandes o suficiente durante o trajeto até o cálice renal e que estes cristais provavelmente ficariam retidos e poderiam dar início à formação de cálculos (Robertson, 2014). As etapas

propostas para a formação de cálculos a partir de plugs de Randall está detalhada na figura abaixo.

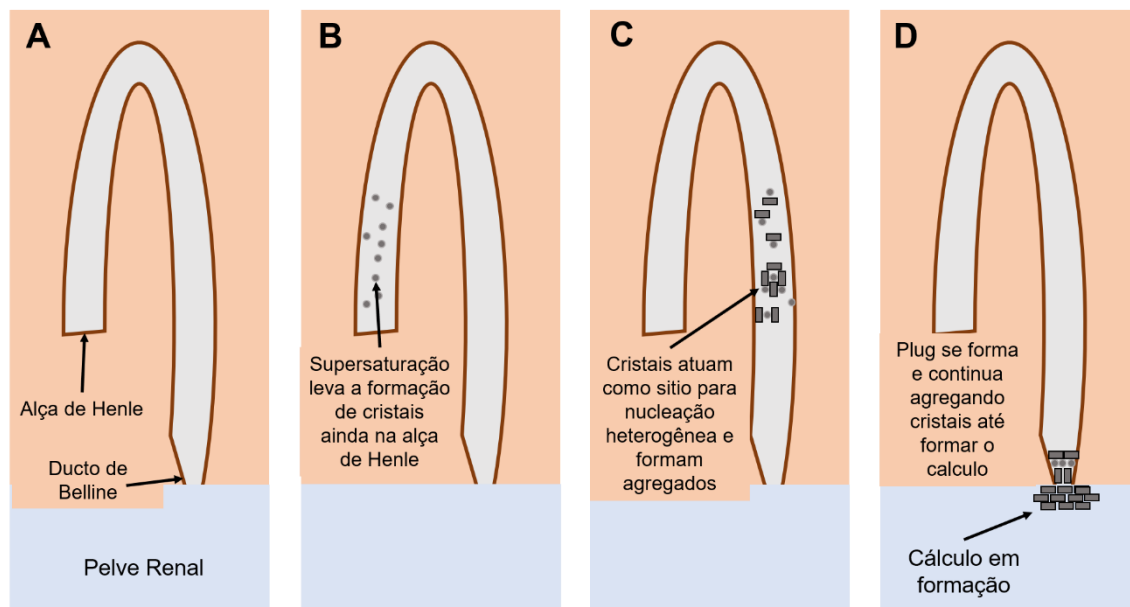


Figura 9. Esquema gráfico ilustrativo da formação de um cálculo renal por meio de um plug de Randall. Região do ramo descendente da alça de Henle, ducto coletor e ducto de Belline, onde formam-se os plugs de Randall (A). Supersaturação elevada de oxalato de cálcio na alça de Henle leva ao início da nucleação precocemente (B). Os cristais pré-formados induzem a nucleação heterogênea e a agregação de novos cristais, e juntos formam agregados grandes o suficientes para ficarem retidos no ducto de Belline (C). O plug de Randall formado fica exposto ao cálice renal, onde funciona como sítio para a agregação constante de cristais, o que resulta na formação do cálculo renal (D). Fonte: autoria própria

No modelo defendido por Robertson, para que a formação dos plugs de Randall ocorra é preciso uma supersaturação de CaOx ou fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) alta o suficiente para que a cristalização se inicie ainda no final da alça descendente de Henle (Figura 9B). A seguir, esses cristais CaOx ou de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ formados anteriormente servem como promotores da nucleação heterogênea para cristais que se formam nos ductos coletores antes da chegada nos ductos de Belline, dando tempo suficiente para que os agregados de cristais tenham tamanho o suficiente para serem retidos (Figura 9C). O plug de Randall ao ser formado serve ponto de agregação para cristais menores de forma análoga ao que foi descrito nas placas de Randall e o cálculo vai se formando (Figura 9D).

Dão suporte a este modelo as protuberâncias de dimensões semelhantes a ductos coletores que são achadas em cálculos retirados (Grases *et al.*, 2016) e a calcificação na luz de ductos coletores revelada em análises histopatológicas (Evan *et al.*, 2014). Além desses achados, há também comprovação quanto ao efeito indutor da agregação e nucleação heterogênea de diferentes componentes da urina como: cristais de ácido úrico (Grases *et al.*, 2007), fragmentos de membrana celular (Fasano e Khan, 2001) e cristais de fosfato de cálcio (Xie *et al.*, 2015) e modelos matemáticos que demonstrando a possibilidade de cristais ficarem retidos nos néfrons devido ao seu tamanho (Robertson, 2014).

Apesar das evidências favoráveis o modelo proposto por Robertson ainda enfrenta resistência e alguns pesquisadores sugerem que o desenvolvimento de cálculos renais a partir dos plugs de Randall ocorre por meio de mecanismos de calcificação, assim como as placas de Randall (Grases *et al.*, 2016; Grases e Söhnel, 2017). Não foram encontrados durante a revisão literária outros modelos para a formação de cálculos renais.

1.8. Inibidores da formação de cálculos renais

A formação dos cálculos renais, como foi mostrado, envolve diversas etapas que dependem uma das outras para o resultado. Portanto, a inibição de qualquer uma das etapas é, por consequência, uma inibição da formação de cálculos renais. A existência de mecanismos de inibição dos cálculos renais parece ser a explicação mais plausível para a pergunta intrigante a respeito desta doença: Por que todos os indivíduos excretam cristais, oxalato, cálcio e fosfato, porém apenas alguns formam cálculos renais mesmo se colocados nas mesmas condições? A resposta mais atual para essa pergunta é: o ser humano possui mecanismos para a inibição da formação de cálculos renais e alguns indivíduos apresentam falhas nos mecanismos de inibição (Alelign e Petros, 2018). O estudo acerca dos inibidores da formação de cálculos é vasto e as vezes contraditório e os principais detalhes sobre este assunto serão abordados a seguir.

1.8.1. Inibidores endógenos da formação de cálculos renais

A urina é um fluido corporal em que se pode encontrar as mais diversas moléculas e íons. Muitos dos elementos presentes na urina são apontados como possíveis inibidores ou até promotores da formação de cálculos renais. Levando em consideração a relevância da atração iônica nos mecanismos para a formação de cálculos renais já citados, pode-se dizer que as moléculas iônicas e íons são os mais prováveis inibidores da formação de cálculos renais (Baumann e Affolter, 2014; Poon e Gohel, 2012; Rimer *et al.*, 2017).

A inibição induzida pela presença de íons magnésio e citrato é esperada, pois esses íons competem com o cálcio e oxalato, formando oxalato de magnésio e citrato de cálcio, respectivamente, e com isso evitam a formação do oxalato de cálcio. Uma evidência que endossa essa proposição teórica é a relação entre pessoas que apresentam baixas concentrações de magnésio e citrato na urina e maior probabilidade de desenvolver cálculos renais de oxalato de cálcio (Khan *et al.*, 2016).

Além dos íons há também moléculas orgânicas que interferem na cristalização do CaOx e conseqüentemente na formação de cálculos renais, as principais moléculas estudadas são os glicosaminoglicanos (Dissayabutra *et al.*, 2019), a osteopontina (Anan *et al.*, 2020; Langdon e Grohe, 2016), uma proteína presente em grandes quantidades na urina e rica em resíduos de aminoácidos de cadeia ácida, e a proteína de Tamm-Horsfall.

A atuação dos GAGs na prevenção dos cálculos renais dar-se por meio da promoção da nucleação heterógena de CaOx sob o arcabouço carregado do GAGs. A nucleação heterogênea leva a formação de cristais em maior número, porém de menor tamanho, os quais são mais propensos a serem levados pelo fluxo da urina e não ficarem retidos nos nefros. Além disso os cristais formados na presença dos GAGs possuem maior carga superficial e com isso se repelem naturalmente, o que reduz a chance de formarem agregados (Poon e Gohel, 2012).

O papel das proteínas osteopontina e proteína Tamm-Horsfall na prevenção da urolitíase é mais bem documentado e já foi avaliado *in vivo*. O efeito do nocaute dos genes da osteopontina e proteína de Tamm-Horsfall foi avaliado em experimentos em camundongos expostos a hiperoxalúria por ingestão de etilenoglicol, e observou-se que os camundongos cujo os genes foram nocauteados tiveram maior facilidade para a calcificação no espaço intersticial das alças de Henle após o tratamento com etilenoglicol (Mo *et al.*, 2007; Wesson, 2003), a ação da osteopontina, em particular, pode ser explicado tanto pela ação direta das proteínas nos cristais ou pela ação indireta de inibição da calcificação ectópica da osteopontina (Ge *et al.*, 2017), enquanto a ação da Tamm-Horsfall ocorre, provavelmente, devido a inibição da agregação entre cristais CaOx que essa proteína promove (Viswanathan *et al.*, 2011).

1.8.2. Inibidores exógenos da formação de cálculos renais

Encontrar compostos inibidores da formação de cálculos renais que possam ser ingeridos por pessoas é o objetivo de muitos trabalhos científicos. Devido às várias etapas para a formação de cálculos renais, compostos com diferentes propriedades farmacológicas podem ser potencialmente inibidores da formação de cálculos renais, como agentes antioxidantes (Kanlaya, Singhto e Thongboonkerd, 2016), anti-inflamatórios (Joshi *et al.*, 2015), anti osteogênicos (Sakhaee *et al.*, 2011) e diluidores da urina (Jiao, Yu, Zhang e Ewart, H., 2011), além de compostos que seriam exclusivamente inibidores, como os que interferiam diretamente na cristalização de CaOx (Gomes *et al.*, 2019). Entretanto, apesar de vários medicamentos fitoterápicos terem sido propostos na literatura ainda não há consenso se são eficientes na prevenção dos cálculos renais (Nirumand *et al.*, 2018).

Dentre os vários candidatos à inibidores da formação de cálculos renais, estão presentes os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, compostos com comprovada ação antioxidante (Costa *et al.*, 2010) e que já foram descritos como moduladores da cristalização do CaOx (Melo *et al.*, 2013; Ouyang *et al.*, 2010; Zhang, C. Y. *et al.*, 2012). Além de serem quimicamente semelhantes à inibidores endógenos, como a osteopontina e os GAGs, pois também são moléculas de elevada carga negativa.

1.9. Algas marinhas e seus polissacarídeos sulfatados: uma visão geral

Algas marinhas são organismos amplamente distribuídos por toda a extensão do litoral mundial. São seres fotossintetizantes e desempenham importante papel na sustentação do ecossistema costeiro. Bioquimicamente, apresentam uma particularidade: a presença de polissacarídeos sulfatados (PS) em sua composição (Gama, Nader e Rocha, 2015). Esse dado é relevante, pois esse tipo de moléculas é encontrado apenas em animais e em algumas poucas espécies de fungos (Cheng *et al.*, 2016) e plantas (Negreiros, Almeida-Lima e Rocha, 2015), entretanto todas as algas marinhas apresentam PS em sua estrutura (Gama, Nader e Rocha, 2015).

As algas marinhas são caracterizadas principalmente em relação ao seu tipo de pigmento, que está intimamente relacionado a sua coloração. Sendo classificadas em três grandes grupos, as algas marrons (Phaeophyta), algas vermelhas (Rhodophyta) e algas verdes (Chlorophyta) (Gama, Nader e Rocha, 2015).

Embora a classificação supracitada seja referente à coloração das algas, ela também é eficiente para diferir as algas também quanto aos tipos de polissacarídeos produzidos por elas, cada um dos grupos de algas produz polissacarídeos que são semelhantes entre si e diferentes dos produzidos por outros classes. (Gama, Nader e Rocha, 2015).

Os PS de algas verdes são os mais variados em relação ao tipo de monossacarídeo constituinte e os menos descritos na literatura. Os principais monossacarídeos constituintes desses PS são ramnose, arabinose e galactose, e em menor quantidade xilose, glicose e ácido glucurônico. Além de variáveis em constituição, os PS de algas verdes também variam muito em conformação, com vários níveis de ramificação e sulfatação (Costa, 2016; Jiao, Yu, Zhang e Ewart, H., 2011; Wang *et al.*, 2014)

Já os PS das algas vermelhas são constituídos quase unicamente de galactose e por isso são os mais homogêneos quando comparados aos de outras algas. Existem três grandes grupos de PS nas Rhodophytas, o ágar, a carragenana e a galactana sulfatada. O ágar e as carragenanas são homopolímeros lineares constituídos apenas por resíduos galactose e anidro galactose, a qual está na forma L-anidro galactose no ágar e D-anidro galactose nas carragenanas. Esses dois resíduos de monossacarídeo formam unidades repetitivas que se distribuem por todo o polímero, a principal característica e aplicação desses polissacarídeos é a capacidade de espessar soluções e preparações. As outras galactanas sulfatadas são mais heterogêneas, pois são construídas por resíduos de outros monossacarídeos e costumam possuir ramificações em suas estruturas (Jiao, Yu, Zhang e Ewart, H. Stephen, 2011; Lim *et al.*, 2018).

Os polissacarídeos sulfatados, em sua grande maioria, encontrados nas algas marinhas marrons estudadas até o momento são polissacarídeos que contêm L-fucose

sulfatada em sua composição. No entanto, algumas exceções podem ser citadas, a exemplo dos polissacarídeos das algas *Sargassum fusiforme* (Zhou *et al.*, 2008) e *Dictyopetris justii* (Melo *et al.*, 2013). Os primeiros relatos desses compostos ocorreram a partir de estudos com espécies das ordens Fucales e Laminariales (Kloareg e Quatrano, 1988). Com o passar do tempo outros gêneros foram incluídos a essa lista, como por exemplo: Chordariales, Dictyotales, Desmerestiales, Dictyosiphonales, Ectocarpales, Sphacelariales e Scytosiphonales (Jesus Raposo, Morais e Morais, 2015; Jiang *et al.*, 2010). E ao se observar estes artigos, além de outros, verifica-se que as algas marrons sintetizam, principalmente, em se tratando de polissacarídeos sulfatados, aqueles que contêm fucose sulfatada, que, atualmente, são denominados de fucanas ou fucoidans.

1.9.1. Polissacarídeos sulfatados de algas marrons

A primeira descrição de polissacarídeos sulfatado contendo fucose sulfatada foi em 1913, quando Kylin extraiu uma substância a partir de *Fucus vesiculosus* e a denominou de fucoidin, o nome foi posteriormente modificado para “fucoidan”, com a terminação “an” que é a adequada para polissacarídeos (Deniaud-Bouët *et al.*, 2014). Entretanto, ainda assim esses dois termos estariam incorretos, pois o monossacarídeo constituinte não é “fucoid”, mas sim fucose e, por isso, o termo utilizado passou a ser fucana (Percival e McDowell, 1967). Apesar de não corresponder a nomenclatura científica correta, os termos fucana e fucoidan passaram a ser utilizados concomitantemente, e, às vezes, como sinônimos, o que levou a IUPAC a determinar que os polissacarídeo sulfatados que tem sua constituição monossacarídica formada de 90% ou mais de fucose, seriam denominadas de fucanas, enquanto as demais seriam chamadas de fucoidans (Berteau e Mulloy, 2003). Apesar da determinação de tal nomenclatura, ela ainda não é totalmente aceita, visto que há casos, a exemplo das homofucanas presentes na alga *Fucus vesiculosus*, em que homofucanas continuam a ser denominadas de fucoidans (Jiao, Yu, Zhang e Ewart, H Stephen, 2011). Questões semânticas a parte, nesta dissertação utilizar-se-ão os termos fucana para referir-se a polissacarídeos que contenham L-fucose sulfatada.

Fucanas são moléculas hidrossolúveis, porém insolúveis em etanol, acetona, clorofórmio e outros solventes orgânicos. Geralmente, suas soluções aquosas possuem pH ligeiramente ácido (aproximadamente 6,4). Quimicamente, as fucanas e, principalmente, os fucoidans, são polissacarídeos com estruturas complexas, mesmo quando um único monômero de L-fucose está presente em sua composição. Além disso, tanto o teor de L-fucose como o de sulfato variam significativamente entre os fucoidans extraídos de diferentes

espécies de algas marrons e sob diferentes condições de processamento (Black, 1953; Nishino, Takabe e Nagumo, 1994).

Estruturalmente, os fucoidans possuem monômeros de L-fucose, galactose ou ácido glucurônico formando um esqueleto principal linear, cuja ligação entre as unidades é constituída de ligação (1 → 3) ou ligação alternada entre (1 → 3) e (1 → 4), com ramificações (1 → 2). Na Figura 10 é mostrado um exemplo da estrutura de fucoidan com esqueleto de constituído de fucose. Os grupamentos sulfato estão ligados principalmente aos carbonos C2 e C4 e, ocasionalmente, no carbono C3 de resíduos de fucose (Conchie e Percival, 1950; Patankar *et al.*, 1993; Silchenko *et al.*, 2013). A presença de sulfato e, às vezes, de carboxila são os principais responsáveis por atribuir às fucanas/fucoidans uma carga total negativa. Geralmente, cada resíduo de fucose contém 1 a 2 grupos sulfatados. Podem estar presentes também, monômeros de fucose formando cadeias laterais ramificadas, o que torna mais complexa a determinação da estrutura de cada fucana/fucoidan extraída(o) de diferentes algas marinhas marrons (Bilan *et al.*, 2018; Chevolot *et al.*, 2001; Marais e Joseleau, 2001; Shen *et al.*, 2018).

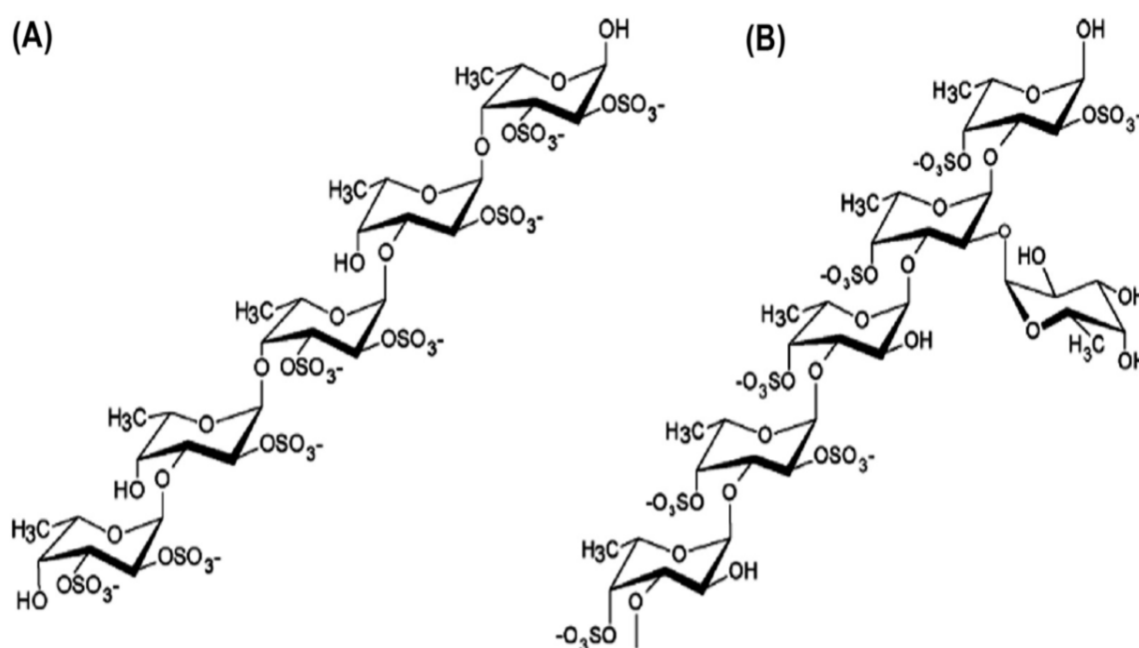


Figura 10. Estrutura clássica de fucoidans extraídos de algas marinhas marrons. (A) Monômeros de fucose constituindo a cadeia principal através de ligações alternada (1 → 3) e (1 → 4), com grupamentos sulfato no carbono C2 ou C3. (B) Cadeia principal composta por monômeros de fucose com ligações (1 → 3) e aleatoriamente ramificações através de ligações (1 → 2), grupamentos sulfato presentes no carbono C2 ou C4. Adaptado de SHEN *et al.*, 2018.

Foi relatado que os outros monossacarídeos, que não a fucose, na estrutura do fucoidan estão numa estrutura altamente heterogênea e ramificada, não são sulfatados e estão presentes na periferia de moléculas altamente ramificadas (Chevolot *et al.*, 2001; Magdel-Din Hussein, Abdel-Aziz e Mohamed Salem, 1980; Mian e Percival, 1973). Todavia, mais e mais

exemplos surgem na literatura refutando esse senso comum (Ale, Mikkelsen e Meyer, 2011; Koh, Lu e Zhou, 2019), inclusive trabalhos do grupo em que está inserida esta dissertação (Leite *et al.*, 1998; Rocha, H. A. O. *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005), como é mostrado na Figura 11, onde está a proposta da estrutura da xilogalactofucana da alga *Spatoglossum schröderi* feita por Leite e colaboradores (1998).

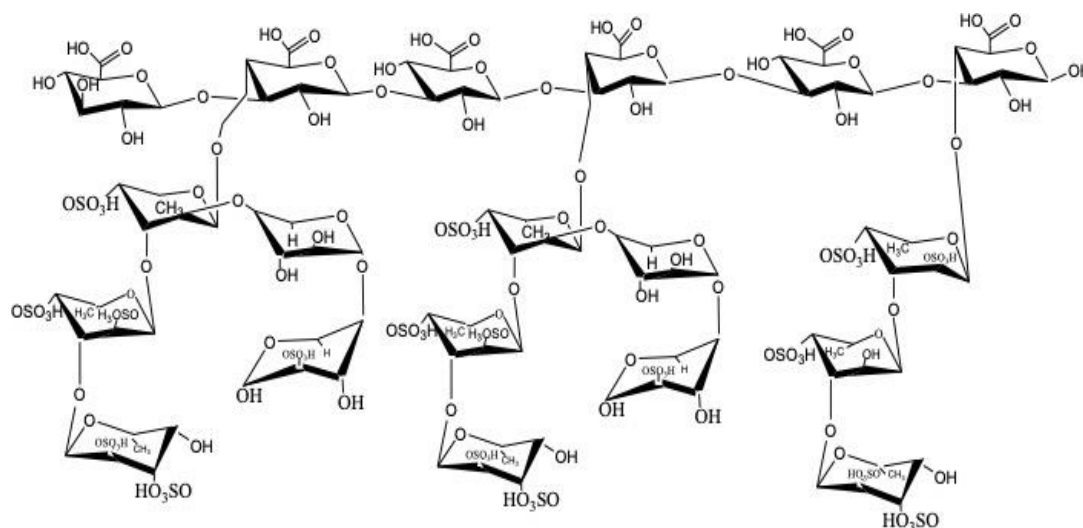


Figura 11. Estrutura da xilofucoglucuronana (fucoidan) sulfatada da alga marrom *Spatoglossum schröderi* proposta por Leite *et al.* (1998)

A estrutura de cada fucana/fucoidan, suas propriedades físico-químicas, bem como, sua composição monossacarídica podem variar de acordo com a espécie de alga, com estação do ano, com o local da coleta e com a metodologia de extração (Black, 1953). A variação desses fatores contribui para diferentes processos biológicos/farmacológicos/biotecnológicos nos quais as fucanas/fucoidans podem atuar. Em particular, o fator mais estudado, é o grau de sulfatação, existindo inclusive, a descrição de trabalhos cujos autores aumentaram o grau de sulfatação de fucoidans para potencializar suas propriedades (Bao, Choi e You, 2010; Oliveira *et al.*, 2017), por exemplo a supersulfatação de fucoidans, que causa aumento da carga total negativa dessas moléculas e facilita a interação dessas com proteínas envolvidas nos mais diversos processos celulares.

1.10. Atividades farmacológicas das fucanas e fucoidans

As fucanas e fucoidans são identificados por diferentes autores como compostos com diversas atividades farmacológicas, biológicas e biotecnológicas. Inclusive há vários artigos recentes de revisão (Cunha e Grenha, 2016; Patil *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2016) que dão detalhes sobre diversos aspectos referentes a essas atividades e que podem ser facilmente consultados. Diante dessa abrangência de dados fez-se uma sumarização dos mesmos e construiu-se a Tabela 1. Nela cita-se atividades que estão mais relacionadas com aquelas descritas para as fucanas e fucoidans de algas tropicais.

Tabela 1 - Algumas atividades farmacológicas atribuídas a fucanas e fucoidans extraídos de algas marinhas marrons.

ATIVIDADE	ALGA	REFERÊNCIA
Antiadesiva	<i>Spatoglossum schröderi</i>	Rocha, H. A. <i>et al.</i> , 2005; Rocha <i>et al.</i> , 2001
Antiadipogênica	<i>Fucus vesiculosos</i> ; <i>Undaria pinnatifida</i> ; <i>Kjellmaniella crassifolia</i> *	Kim e Lee, 2012; Kim, Lee e Lee, 2010; Park, Jung e Roh, 2011; Peng <i>et al.</i> , 2018
Antiangiogênica	<i>Spatoglossum schröderi</i> ; <i>Sargassum vulgare</i> ; <i>Sargassum hemiphyllum</i>	Chen <i>et al.</i> , 2015; Guerra Dore <i>et al.</i> , 2013; Menezes <i>et al.</i> , 2018
Anticoagulante	<i>Dictyopteris delicatula</i> ; <i>Padina minor</i> ; <i>Scytosiphon lomentaria</i>	Billones, Santos e Santos, 2017; Magalhaes <i>et al.</i> , 2011; Ponce <i>et al.</i> , 2019
Anti-inflamatória	<i>Dictyota menstrualis</i> ; <i>Saccharina japônica</i> ; <i>Sargassum horneri</i> ; <i>Dictyota mertensii</i>	Albuquerque <i>et al.</i> , 2004; Fernandes-Negreiros <i>et al.</i> , 2017; Sanjeewa <i>et al.</i> , 2018; Xu <i>et al.</i> , 2018
Antimicrobiana	<i>Fucus vesiculosos</i> ; <i>Sargassum ilicifolium</i> ; <i>Sargassum angustifolium</i> ; <i>Dictyota mertensii</i>	Fernandes-Negreiros <i>et al.</i> , 2017; Kordjazi <i>et al.</i> , 2019; Lu <i>et al.</i> , 2018
Antinociceptiva	<i>Dictyota menstrualis</i> ; <i>Sargassum wightii</i> ; <i>Spatoglossum schröderi</i>	Albuquerque <i>et al.</i> , 2004; Farias <i>et al.</i> , 2011; Neelakandan e Venkatesan, 2016
Antiurólítico	<i>Dictyopteris justii</i> ; <i>Sargassum graminifolium</i> ; <i>Laminaria japonica</i> **	(Melo <i>et al.</i> , 2013; Ouyang <i>et al.</i> , 2010; Zhang, C. Y. <i>et al.</i> , 2012)

Antitrombótica	<i>Spatoglossum schröderi</i> ; <i>Laminaria japonica</i> **; <i>Punctaria plantaginea</i>	Almeida-Lima <i>et al.</i> , 2011; Ustyuzhanina <i>et al.</i> , 2016; Zhao <i>et al.</i> , 2016
Antitumoral	<i>Spatoglossum schröderi</i> ; <i>Undaria pinnatifida</i> ; <i>Dictyopteris delicatula</i> ; <i>Fucus vesiculosos</i> ; <i>Dictyota mertensii</i>	Fernandes-Negreiros <i>et al.</i> , 2017; Lu <i>et al.</i> , 2018; Magalhaes <i>et al.</i> , 2011; Rocha Amorim <i>et al.</i> , 2016; Zayed <i>et al.</i> , 2019
Antiúlceras	<i>Fucus vesiculosos</i> ; <i>Cladosiphon okamuranus</i>	Shibata <i>et al.</i> , 2000, 2003
Antiviral	<i>Undaria pinnatifida</i> ; <i>Adenocystis utricularis</i> , <i>Stoechospermum marginatum</i> , <i>Cystoseira indica</i> <i>Cladosiphon okamuranus</i>	Elizondo-Gonzalez <i>et al.</i> , 2012; Hidari <i>et al.</i> , 2008; Lee <i>et al.</i> , 2004; Shen <i>et al.</i> , 2018
Fibrinolítica	<i>Fucus vesiculosos</i> ; <i>Laminaria japonica</i> **	Nishino <i>et al.</i> , 2000; Zhao <i>et al.</i> , 2016
Hepatoprotectora	<i>Kjellmaniella crassifolia</i> *; <i>Fucus vesiculosos</i> ; <i>Turbinaria decurrens</i> ; <i>Turbinaria tricostata</i> ; <i>Cladosiphon okamuranus</i>	Chale-Dzul <i>et al.</i> , 2015; Liu <i>et al.</i> , 2018; Meenakshi <i>et al.</i> , 2014; Nakazato <i>et al.</i> , 2010
Antioxidante	<i>Laminaria japonica</i> **; <i>Sargassum fulvellum</i> ; <i>Sargassum glaucescens</i> ; <i>Sargassum pallidum</i> ; <i>Sargassum filipendula</i> ; <i>Sargassum fusiforme</i> ; <i>Sargassum vulgare</i> ; <i>Chnoospora mínima</i> ; <i>Sargassum polycystum</i>	Costa <i>et al.</i> , 2010; Dore <i>et al.</i> , 2013; Huang <i>et al.</i> , 2016; Kim <i>et al.</i> , 2018, 2007; Presa <i>et al.</i> , 2018; Wang <i>et al.</i> , 2008, 2010

Osteogênico	<i>Laminaria japonica</i> **; <i>Sargassum hemiphyllum</i> ; <i>Undaria pinnatifida</i> ; <i>Fucus vesiculosos</i>	Cho <i>et al.</i> , 2009; Hwang <i>et al.</i> , 2016; Kim <i>et al.</i> , 2018, 2015; Park <i>et al.</i> , 2012
-------------	--	---

* A sinonímia mais atual para essa espécie é *Saccharina sculpera*

** A sinonímia mais atual para essa espécie é *Saccharina japonica*

Em uma das linhas da Tabela 1 é observado a atividade antiurolítica de fucanas e fucoidans de algas marrons, tal atividade será descrita a seguir com mais detalhes, pois ela tem relação direta com os dados apresentados do tópico de Resultados nesta dissertação.

Os PS de algas marinha têm a capacidade de inibir a formação, o crescimento e a agregação dos cristais de CaOx, as quais derivam da alta carga negativa que essas moléculas possuem, por isso alguns autores sugerem que o número de grupamentos sulfato ou carboxílicos são proporcionais à atividade antiurolítica dos PS (Akın *et al.*, 2008; Bhadja, Lunagariya e Ouyang, 2016; Huang *et al.*, 2017). Os PS inibem a nucleação do CaOx ligando-se ao cálcio livre em solução e impedindo que esse interaja com o oxalato (Zhang, C.-Y. *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015), já a inibição do crescimento e da agregação acontece devido a adsorção das moléculas de PS nas faces dos cristais formados, essa adsorção muda a carga de superfície dos cristais e evita que novos íons adiram aos cristais e que eles interagem entre si para se agregarem (Bhadja, Lunagariya e Ouyang, 2016; Gomes *et al.*, 2019; Melo *et al.*, 2013). Usualmente, PS de menores massas moleculares inibem com maior intensidade o crescimento e agregação (Bhadja, Lunagariya e Ouyang, 2016; Ouyang *et al.*, 2010), o que ocorre provavelmente devido a facilidade com que moléculas pequenas expõem as cargas negativa. Além disso, o número de cargas negativa também é proporcional a inibição do crescimento/agregação (Akın *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2017).

Contudo é importante lembrar que a ação antiurolítica define-se como a capacidade de inibir a formação de cálculos renais, por isso a ação antiurolítica dos PS de algas marinha não se limita apenas aos efeitos na cristalização do CaOx e abrange também a atividade antioxidante e de prevenção de injúria nos túbulos renais (Bhadja, Lunagariya e Ouyang, 2016; Khan *et al.*, 2016).

1.11. *Dictyopteris delicatula*

A espécie de alga marinha *Dictyopteris delicatula* foi descrita no início do século XIX (Lamouroux, 1809) e já foi utilizada pelo grupo de pesquisa em que se insere esta dissertação anteriormente em trabalhos acerca da ação anticoagulante, antioxidante e antitumoral dos seus PS (Costa *et al.*, 2010; Magalhaes *et al.*, 2011). Além de fonte de PS, a *D. delicatula* também é fonte de ácidos graxos, polifenóis, β -caroteno e α -tocoferol (Zatelli, Philippus e Falkenberg, 2018). Extratos da *D. delicatula* já demonstraram ação antibacteriana (Perez G.

et al., 1990), antioxidante *in vivo* (Vasconcelos, Vasconcelos e Bezerra, 2017), antiviral (Soares *et al.*, 2012) e larvicida (Bianco *et al.*, 2013), sendo cada ação relacionada diretamente com o solvente usado na extração (Zatelli, Philippus e Falkenberg, 2018).

O motivo de escolha da *D. delicatula* para este trabalho vem devido ao alto grau de sulfatação dos seus PS (Magalhaes *et al.*, 2011), que indica *a priori* potencial de inibição da cristalização do CaOx, à grande disponibilidade da alga nas praias de Natal/RN (Azevedo *et al.*, 2011) e ao fato do grupo em que se insere este trabalho já ter descrito atividade antiurolítica em polissacarídeos sulfatados de outra marrom da mesma família, a *Dictyopteris justii* (Melo *et al.*, 2013).

Os polissacarídeos da alga *D. justii*, apesar de possuírem baixa concentração de sulfato, apresentaram bom potencial modulador da cristalização de CaOx (Melo *et al.*, 2013), por isso espera-se que os polissacarídeos da alga *D. delicatula*, que são mais sulfatados (Magalhaes *et al.*, 2011), seriam ainda mais efetivos na modulação da cristalização, esse também foi um dos motivos de escolha da *D. delicatula*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Obter frações ricas em polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Dictyopteris delicatula* e avaliar o seu potencial antiurolítico, a partir da determinação das suas atividades antioxidante e moduladora da cristalização de CaOx.

2.2. Objetivos específicos

- Coletar a alga *D. delicatula* e extrair frações ricas em polissacarídeos sulfatados;
- Caracterizar físico-quimicamente as diferentes frações ricas em polissacarídeos sulfatados;
- Avaliar a capacidade das diferentes frações em modular a cristalização do CaOx e a partir dos dados obtidos escolher a fração de maior ação moduladora;
- Avaliar a citotoxicidade em células MDCK da fração escolhida;
- Avaliar o potencial da fração selecionada em mitigar o dano oxidativo causado em células MDCK devido à exposição ao peróxido de hidrogênio;
- Fracionar por cromatografia de troca iônica a fração de maior ação antiurolítica e caracterizar físico-quimicamente as subfrações obtidas;
- Avaliar as atividades antioxidantes *in vitro* e modeladora da cristalização de CaOx das subfrações obtidas comparando-as com os dados da fração escolhida.

3. Materiais e métodos

3.1. A alga *Dictyopteris delicatula*

A alga *Dictyopteris delicatula* (Figura 12) pertence a seguinte classificação filogenética:

Filo: Ochrophyta

Classe: Phaeophyceae

Subclasse: Dictyotophycidae

Ordem: Dictyotales

Família: Dictyotaceae

Tribo: Zonarieae

Gênero: *Dictyopteris*

Espécie: *Dictyopteris delicatula*



Figura 12. Fotografia da alga *Dictyota delicatula* coletadas na praia de Pirambúzios/RN e utilizada nesse trabalho. Fonte: Autoria própria

3.2. Linhagem de células

Foi utilizado neste trabalho a linhagem de células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), uma célula epitelial extraída do rim de cachorro em setembro de 1958 por S. Madin, N.B. Darby e que está depositada na American Type Culture Collection (ATCC) com o código CLL-34™, as células foram obtidas comercialmente da ATCC.

3.3. Equipamentos

- Agitador orbital modelo 255-B, banhos-maria e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Cuba para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col. (1968), da Técnica Permatron Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Liofilizador – FreeZone 4.5 foi obtido da Labcon;
- Centrífuga refrigerada modelo 5804 R da Eppendorf (Hamburg, Alemanha);
- Centrífuga refrigerada da Thermo scientific, Modelo Sorvall Legend XRT, 2014 (Massachusetts, Estados Unidos);
- Fontes de corrente contínua PowerPac™ HC fabricada pela Bio-Rad Laboratories, Inc. (California, Estados Unidos);
- Espectrofotômetro Femto 700 plus, Femto Ind. Com. Instrumentos Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Medidor de pH modelo TEC-5, produzido pela Tecnal (Piracicaba, São Paulo, EUA);
- Espectrômetro FTIR- 8400S, modelo IRAffinity-1 (Shimadzu, Japão);
- Bomba a vácuo da TECNAL modelo TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Bancada de Fluxo Laminar Pachane Pa300 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Banhos e estufas de temperatura controlável da FANEM Ltda (São Paulo, SP, Brasil);

- Osmose reversa, Dertin Pump (Diaphragm Pump) Modelo 8809, Resina MB478, Work Pressure:70PSI, Volts: 24VDC, (São Paulo, SP, Brasil);
- Destilador de água MA-270 da Marconi Ltda (Piracicaba, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro digital DR5000 UV/VIS da Hach Company® (Colorado, EUA);
- Zeta Plus - Zeta Potential Analyzer, ano 2012, foi obtido da Brookhaven (New York, USA);
- Sistema HPLC, Merck (Richmond, CA, EUA) com coluna LiChroCART 250-4 LiChospher 100 NH2 (10µm) acoplada;
- Incubadora de CO₂ com jaqueta de ar modelo L212 produzida pela Laboven (USA);
- Leitor de microplacas Epoch-Biotek (Winooski, VT, EUA)
- Microscópio NIKON Eclipse Ti-U (Melville, NY, EUA);
- Purificador de água Barnstead™ NanoPure 7155 da Thermo Scientific. (Massachusetts, Estados Unidos);

3.4. Reagentes

- Ácido sulfúrico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio, azul de toluidina, acetona, ácido clorídrico, álcool etílico, brometo de cetiltrimetilamônio P.A., citrato de sódio, cloreto de bário e peróxido de hidrogênio foram adquiridos da CRQ (Diadema, SP, Brasil).
- Bacto-Gelatina adquirido da Difco Laboratories (Detroit, MI, USA).
- Ácido etilenodiminotetracético (EDTA), metanol, cloreto de cálcio e oxalato de sódio foram obtidos da VETEC (São Paulo, Brasil respectivamente).
- Ácido gálico foram comprados da CAQ Casa da Química Ind. E Com. (Diadma, SP, Brasil).
- Metionina proveniente da Synth (Diadema, SP, Brasil). - Ácido ascórbico, nitroblue tetrazolium (NBT), cloreto de sódio, 1,3- diaminopropano acetato,ferrozina, riboflavina, nitrito de sódio, nitroprussiato de sódio, albumina sérica bovina, brometo de tetrazólio azul de tiazol e os padrões de L-fucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, D- glucose, D-arabnose, D-ramnose e ácido D-glucurônico foram adquiridos da Sigma- Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).
- Agarose (Standart Low-MR) proveniente da BioRAAd Laboratories (Richmond, CA, EUA).
- Kit para dosagem de cálcio iônico obtido da ELItech (Puteaux, France)
- Reagente Folin-Ciocalteau foram adquiridos da Merk (Darmstadt, Alemanha).
- Fenol e Molibdato de amônia e sulfato de sódio foram adquiridos da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

- Ácido acético glacial foi obtido da CRB–Cromato produtos químico Ltda (São Paulo, Brasil).
- Prozima (Preparação enzimática a base de protease alcalina PROLAV 750) adquiridos da Prozyn Biosolutions, São Paulo, Brasil
- Salicilato de sódio adquirido da FLUKA (Steinheim, Germany)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da Cultilab (Campinas, SP, Brasil).

3.5. Coleta e limpeza da alga *Dictyopteris delicatula*

A alga *D. delicatula* foi coletada na praia de Pirambúzios-RN (05°58'23"S 35°04'97'O), litoral nordeste do Brasil. Foi classificada com base nas seguintes características morfológicas: bifurcações arredondadas conforme se aproxima da extremidade, ausência de ranhuras ou marcas horizontais, extremidades arredondadas semelhantes a dedos e presença de “veia central” horizontal em todas a alga (Wynne, 1986), além do tamanho curto e a presença de epifitismo.

A *D. delicatula* foi limpa para que fosse removido: areia, outras algas e crustáceos, depois a alga foi seca em estufa aerada. A despigmentação da *D. delicatula* deu-se por meio de maceração em etanol absoluto durante cinco dias, o solvente foi totalmente substituído a cada 12 h ou até que se observasse saturação de pigmentos, a alga foi considerada despigmentada quando não se percebeu mais coloração no solvente. Por fim, a *D. delicatula* limpa e despigmentada foi utilizada na extração proteolítica. Esta coleta está registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético – SisGen sob o número A0D4240 – SISGEN. Um exemplar proveniente da coleta realizadas neste trabalho está disponível no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte com o número de depósito 25520.

3.6. Extração proteolítica e fracionamento dos componentes da alga *D. delicatula*

A extração de compostos da *D. delicatula* deu-se por meio de uma incubação à quente em ambiente salino/alcalino e com adição de proteases (prozima). Esse processo de extração foi denominado como proteólise alcalina (Cássaro e Dietrich, 1977). Cerca de 170 grama de *D. delicatula* despigmentada foi selecionada e acondicionada em proveta graduada e o volume ocupado pela alga foi determinado, adicionou solução de 0,25 M de cloreto de sódio (NaCl) em volume correspondente ao dobro do volume de alga, de forma que toda a alga ficasse imersa em solução salina. A mistura de alga e solução de NaCl foi deixada em repouso durante 30 minutos para que toda a alga fosse hidratada. O pH da mistura de alga e solução de NaCl foi ajustado para 8,0 pela adição de volumes pequenos de solução de 1 M de hidróxido de sódio (NaOH), apenas após o ajuste do pH a 8,0 a prozima foi adicionada. Por

fim, a proteólise alcalina foi realizada por incubação dessa suspensão de *D. delicatula* durante 18 h a 60 °C.

Após o término da proteólise, a mistura resultante foi filtrada e os fragmentos de algas restantes foram descartados. Porém, mesmo após a filtração, a mistura ainda continha componentes insolúveis, muitos fragmentos e partículas pequenas, os quais foram removidos por centrifugação (10000 g por 30 minutos). O sobrenadante, que continha os polissacarídeos sulfatados, obtido após a centrifugação teve seu volume determinado e posteriormente foi fracionado.

O fracionamento dos compostos deu-se por meio de precipitação induzida por adição seriada de acetona (Rocha *et al.*, 2005). Na Figura 13 mostra-se um esquema lúdico que corresponde aos volumes de acetona acrescentados a solução inicial com o intuito de obter-se diferentes frações. O volume do sobrenadante obtido após a centrifugação do proteolizado foi considerado como 1,0v e referente a ele determinou-se os volumes de acetona a serem adicionados. Adicionou-se cinco vezes acetona ao extrato da proteólise, nos volumes de 0,5v; 0,7v; 1,0v; 1,5v; e 2,0v (Figura 13). Os valores de volume de acetona utilizados nesse trabalho basearam-se em trabalhos anteriores com *D. delicatula* (Magalhaes *et al.*, 2011)

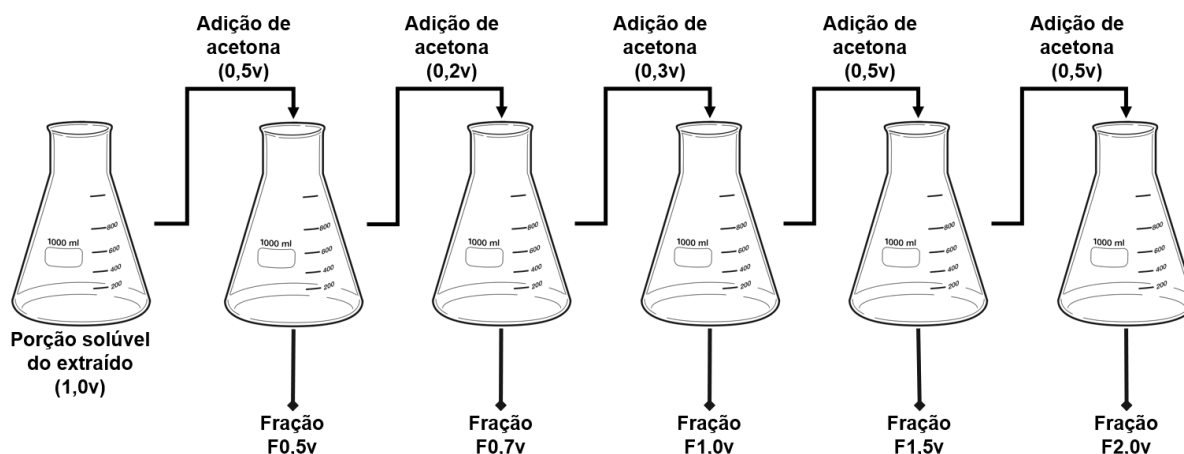


Figura 13. Esquema ilustrativo representação o procedimento adotado para o fracionamento da porção solúvel do extraído na proteólise. O volume da porção solúvel do extraído foi designado como 1,0v ou 1,0 volumes e relativo a este volume determinou-se os volumes de acetona adicionado. Fonte: Autoria própria

Após cada adição de acetona, a mistura resultante foi mantida por 18 h a 4 °C para precipitação da respectiva fração. A obtenção da porção precipitada deu-se por centrifugação (10000 g por 30 minutos a 4 °C). Os materiais precipitados nas centrifugações foram designados como frações cetônicas. As frações cetônicas foram nomeadas de acordo com o volume de acetona adicionado para que houvesse sua respectiva fração. As frações cetônicas obtidas foram; F0,5v; F0,7v; F1,0v; F1,5; e F2,0v (Figura 13).

3.7. Caracterização físico-química das frações cetônicas

As frações cetônicas obtidas pelo processo de fracionamento com acetona foram analisadas físico-quimicamente quanto a quantidade de: açúcares totais, proteínas, compostos fenólicos e sulfato e pelo perfil eletroforéticos e pela composição monossacarídica.

3.7.1. Dosagem de açúcares totais

A quantificação de açúcares totais presentes nas frações cetônicas deu-se por meio do método fenol/H₂SO₄ (Dubois *et al.*, 1956), usando L-fucose como padrão. Sucintamente, as diferentes frações cetônicas foram solubilizadas na concentração de 1 mg/mL em água destilada, 100 µL de cada fração foi adicionada aos tubos. Os experimentos foram realizados em triplicata. A curva de calibração foi feita utilizando as massas de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 µg de L-fucose e o branco realizado apenas com água destilada, todos também em triplicata. O volume das amostras foi ajustado para 1 mL adicionando água destilada, para que ao adicionar o ácido posteriormente fosse gerado calor suficiente para a desidratação do açúcar, depois adicionou-se a todos os tubos, inclusive o branco, 25 µL de fenol 80%. Logo após a adição do fenol, adicionou-se, com auxílio de um bureta, 2,5 mL de ácido sulfúrico P.A a cada tubo. Após a adição do ácido os tubos foram agitados e deixados em banho maria a 37 °C por 30 minutos para garantir o máximo de reação. Os tubos foram lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, a quantidade de açúcar presente nas amostras foi determinada comparando a absorbância obtida nos padrões de fucose e a absorbância obtida nas amostras.

A adição rápida do ácido forte gera bastante calor e aquece a solução, a junção de alta temperatura e ambiente ácido promove a hidrólise do polissacarídeo e a desidratação dos monossacarídeos, os quais se convertem a fufural, no caso das pentoses, e hidroximetilfufural, no caso das hexoses. Esses compostos possuem naturalmente absorção no comprimento de onda de 480 e 490 nm, respectivamente.

3.7.2. Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina bovina sérica como padrão e adaptado para microplacas (Alves *et al.*, 2012). Resumidamente, adicionou-se 100 µg em 10 µL das diferentes amostras ou água destilada, para o branco, nos poços da microplaca. Depois adicionou-se 190 µL de reagente de Bradford, composto principalmente pelo azul brilhante de Coomassie em meio ácido, a todos os poços. A placa foi deixada em repouso por 5 minutos e depois realizada a leitura da absorbância dos poços em leitor de microplaca no comprimento de onda de 595 nm. Poços

contendo albumina bovina sérica (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 µg), também foram submetidos ao mesmo processo para se obter uma curva de calibração.

O azul brilhante de Coomassie livre apresenta uma coloração vermelho azulada, que resultam num tom “amarronzado”, porém ao entrar em contato com os aminoácidos: fenilalanina, prolina, triptofano e/ou arginina passa a apresentar uma coloração azul intensa e sem tons de vermelho. Essa variação na coloração é detectada pela mudança na absorvância em 595 nm e comparando os resultados obtidos nas amostras com os da curva de calibração é possível determinar a quantidade de proteínas presente nas amostras.

3.7.3. Dosagem de compostos fenólicos

A quantidade de compostos fenólicos totais foi determinada por meio do reagente de Folin-Ciocalteu (Chandler e Dodds, 1983), usando ácido gálico como padrão. Brevemente, 1600 µL de cada amostra foi incubada com 100 µL reagente de Folin-Ciocalteu (10% tungstato de sódio, 2,5% molibdato de sódio, 10% ácido hidrocloreídrico, 4,5% de ácido fosfórico e 15% de sulfato de lítio) em tubos de ensaio durante 10 minutos, depois foram adicionados aos tubos 200 µL de solução de carbonato de sódio a 20% e os tubos foram deixados em banho maria a 40 °C durante 20 minutos, por fim mediou-se a absorvância do conteúdo dos diferentes tubos no comprimento de onda de 765 nm. Os mesmos procedimentos citados foram adotados utilizando água destilada no lugar da amostra (o branco) e quantidades conhecidas de ácido gálico para fazer a curva de calibração.

O reagente de Folin-Ciocalteu contém os ácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos que são reduzidos pelos compostos fenólicos presentes na amostra e formam um molibdato-tungstênio, que tem coloração azulada. A coloração azulada dos compostos formados contrasta com a coloração esverdeada do reagente antes da reação, essa variação de cor permite determinar a quantidade de compostos fenólicos na amostra.

3.7.4. Dosagem de sulfato

As frações cetônicas foram submetidas a hidrólise ácida intensa assistida por calor para que as ligações ésteres entre os grupos sulfatos e os monossacarídeos fossem quebradas, e os grupamentos sulfatos, agora liberados, fossem quantificados pelo método de gelatina bário (Dodgson e Price, 1962). O sulfato de sódio (Na₂SO₄) foi utilizado como padrão para fazer a curva de calibração.

Antes da realização do ensaio foi preciso preparar as amostras hidrolisadas. Uma alíquota de 2 mg de cada amostra foi solubilizada em solução de ácido clorídrico (4 M) e aquecida à 100 °C durante 6 h para obter a amostra hidrolisada.

Na realização do ensaio propriamente dito uma alíquota das amostras hidrolisadas foi misturada com a gelatina-bário (2% gelatina e 2% cloreto de bário) em tubos de vidro e

deixadas repousar durante 15 minutos, depois a absorvância em 500 nm dos tubos foram lidas em espectrofotômetro.

A interação do sulfato com o bário forma sulfato de bário que é um sal insolúvel e que turva a solução, portanto a quantidade de turbidez, que é medida pela absorvância em 500 nm, reflete a quantidade de sulfato na amostra. A partir da curva de calibração do sulfato de sódio foi possível determinar a quantidade de sulfato presente em cada amostra.

3.7.5. Eletroforese em gel de agarose e tampão PDA

As diferentes amostras foram caracterizadas por meio da migração diferenciada em gel de agarose. O gel de agarose utilizado foi confeccionado solubilizando a agarose à quente na concentração de 0,6%, em tampão de 50 mM de propano-1,3-diamina pH 8,0, e deixando para polimerizar repouso overnight à 4°C (Dietrich e Dietrich, 1976). Os géis foram polimerizados em molde retangular de forma que os eles tivessem 5 mm de espessura.

Os poços foram feitos com tiras de papel filtro de 2 mm de espessura numa das extremidades longitudinais do gel, as tiras de papel filtro foram deixadas durante 5 minutos dentro dos poços e então removidas, depois a solução das amostras foram aplicadas nos poços. O papel filtro foi utilizado pois é absorvente e remove o excesso de tampão presente nos poços recém formados, e com isso evita o extravasamento da amostra após aplicação no poço.

Em cada poço aplicou-se 5 µL de amostra, na concentração de 10 mg/mL, num dos poços aplicou-se 3 µL de vermelho de fenol, na concentração de 5 mg/mL, para que fosse possível observar a corrida eletroforética. O gel de eletroforese contendo as amostras foi colocado na cuba de eletroforese de forma que as amostras ficassem no cátodo, já que moléculas carregadas negativamente migram para o ânodo. A corrida eletroforética foi performada na tensão de 110 V e durante 90 minutos.

Após o término da corrida, o gel foi imerso em 0,1% de brometo de cetiltrimetilamônio (CTV) durante 4 horas para que houvesse a precipitação das bandas presentes. Depois, o gel foi seco em fluxo de ar quente e corado por imersão em solução de 0,1% de azul de toluidina (49% etanol, 50% H₂O e 1% ácido acético). A coloração inespecífica ocasionada pelo azul de toluidina foi removida com auxílio de uma solução descorante (mesma constituição da solução corante, porém sem o azul de toluidina), de forma que apenas as bandas formadas por polissacarídeos sulfatados ficassem coradas.

3.7.6. Determinação da composição monossacarídica das frações cetônicas

As diferentes amostras foram submetidas a hidrólise ácida assistida por calor e os monossacarídeos livres foram analisados por HPLC (Melo-Silveira *et al.*, 2012). Uma alíquota de 2 mg de cada fração foi solubilizada em HCl 2 M e aquecida a 100 °C durante duas horas.

Os monossacarídeos liberados resultantes da hidrólise foram analisados por HPLC sistema VWR-Hitachi LaChrom Elite® HPLC com um detector de índice de refração L-2490 refractive. A coluna utilizada foi a LichroCART® 250-4 column (250 mm x40 mm) empacotada com Lichrospher® 100 NH2 (5 µm). A massa de amostra utilizada foi de 0,2 mg por corrida, o tempo de corrida foi de 15 minutos com um fluxo de 1 mL por minuto. A fase móvel utilizada foi uma mistura de água ultra purificada e acetonitrila, na proporção de 20:80, respectivamente. A identificação dos monossacarídeos deu-se comparando os cromatogramas obtidos nas corridas das amostras com os obtidos nas corridas de padrões comercial de; glucose, galactose, manose, fucose, xilose e ácido glucurônico, arabinose e frutose. Os padrões foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich.

Para determinar a razão molar, a quantidade de mols de cada monossacarídeo foi normalizada com a quantidade de mols de fucose presente na mesma amostra. O percentual de cada monossacarídeo foi determinado pela divisão da quantidade de mols do respectivo monossacarídeo pela soma da quantidade de mols de todos os monossacarídeos presentes na respectiva amostra.

3.8. Indução da cristalização do oxalato de cálcio para os diferentes ensaios realizados

Uma solução supersaturada de oxalato de cálcio (CaOx) foi formada a partir da mistura de duas soluções. A primeira solução (12 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, 10 mM C₂H₃NaO₂) contendo cloreto de cálcio (CaCl₂) e a segunda (2 mM Na₂C₂O₄, 200 mM NaCl, 10 mM C₂H₃NaO₂) contendo oxalato de sódio (Na₂C₂O₄), ambas com o pH ajustado para 5,7, sendo determinadas daqui em diante como solução de cálcio e solução de oxalato, respectivamente.

Primeiro acomodou-se 100 µL da solução de cálcio no poço de microplaca de 96 poços, a qual continha ou não uma das frações cetônicas, depois adicionou-se o mesmo volume da solução de oxalato de sódio nos poços para a indução da cristalização, resultando numa solução supersaturada contendo 6 mM de CaCl₂ e 1 mM Na₂C₂O₄ (Zhang, C. Y. *et al.*, 2012), logo após a mistura já inicia-se a cristalização do CaOx.

Após a formação da solução supersaturada de CaOx ela foi deixada em repouso durante 18 h em temperatura ambiente para que os cristais de CaOx fossem formados e sedimentassem. Para as análises de microscopia óptica foram fotografados os fundos dos poços da placa e para a quantificação de cálcio retirou-se uma alíquota do sobrenadante presente em cada poço.

Para a realização da “Espectrometria por infravermelho por transformada de Fourier” os cristais CaOx foram formados como descrito anteriormente na seção 3.7., apenas alterando o recipiente onde foi realizada a cristalização para uma de 6 poços. Após a

cristalização os poços foram raspados com o auxílio de um *Cell Scraper* e suspensos em água destilada. A suspensão contendo cristais CaOx foi então centrifugada a 4500 g por 10 minutos, o pellet contendo os cristais CaOx foi lavado duas vezes com água destilada para a remoção de sais contaminantes, depois os cristais secos foram analisados conforme será descrito posteriormente

Para a realização da “avaliação espectrofotométrica da cristalização de oxalato de cálcio” os cristais CaOx foram formados como descrito anteriormente na 3.7., alterando mais uma vez o recipiente onde foi realizada a cristalização, que nesse caso ocorreu na própria cubeta do espectrofotômetro (Zhang, C. Y. *et al.*, 2012).

3.9. Análise de microscopia óptica dos cristais CaOx

Os cristais de CaOx, formados na presença ou ausência de uma das frações cetônicas, foram fotografados obedecendo uma ordem lógica, as imagens foram obtidas seguindo uma linha mediana que cruzava o poço. Dessa forma houve uma representatividade igualitária de todas as regiões do poço. Esta representatividade é fundamental para que seja possível comparar os resultados obtidos a partir das diferentes amostras utilizadas.

A partir das imagens obtidas os cristais CaOx foram contados, medidos e diferenciados quanto à morfologia em COM e COD. Usou-se como padrão para considerar o cristal como COD a forma bipiramidal e com COM a forma prismática. O percentual de cristais COD foi calculado dividindo a média do nº de COD pelo nº total de cristais CaOx (COM + COD) e multiplicando por 100

Devido a morfologia prismática dos COM eles foram medidos quanto ao seu comprimento, pois essa é a dimensão mais relevante, já os COD devido a morfologia bipiramidal foram medidos quanto à lateral da base da pirâmide, o que foi denominado de “tamanho dos COD”.

3.10. Avaliação espectrofotométrica da cristalização de oxalato de cálcio

A nucleação e a agregação são etapas da cristalização que ocorrem rapidamente e apenas durante o início da cristalização, portanto, para a compreensão do efeito da presença das frações cetônicas nessas etapas este experimento foi realizado desta forma: as soluções supersaturadas foram formadas como está descrito na seção 3.7., e imediatamente passaram a ser analisada por medições da absorbância em 620 nm. As medições de absorbância ocorrem a cada 2 minutos durante quarenta e cinco minutos (Queiroz *et al.*, 2015).

Os valores de absorbância obtidos nas leitoras foram expostos em gráficos e avaliados quanto a: máxima absorbância, que representa o número de cristais formados, variação de absorbância entre os minutos 0 e 6, que representa a intensidade da nucleação,

e a variação de absorvância entre os minutos 7 e 13, que representa a intensidade da agregação (Baumann, Affolter e Casella, 2011; Baumann e Casella, 2019a).

3.11. Avaliação do potencial zeta dos cristais CaOx

O potencial zeta corresponde à carga superficial das diferentes partículas, que pode ser negativa ou positiva. O potencial zeta dos cristais CaOx formado na presença ou ausência de diferentes FRPS foi avaliado por meio do *Zeta Potential Analyzer* “ZetaPlus”, da Brookhaven. Brevemente, após o término da cristalização os cristais foram centrifugados 4500 g durante cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. Os cristais foram lavados por alternância de adição de água destilada e centrifugação duas vezes, para que não houvesse polissacarídeo livre em solução que atrapalhasse a medição do potencial zeta. Após as lavagens os cristais ressuspensos em água destilada e analisados pelo equipamento.

3.12. Subfracionamento da fração F0,5v por cromatografia de troca iônica

Utilizando como critérios a atividade modulatória na cristalização de CaOx e o rendimento relativo em relação à massa, selecionou-se a fração F0,5v para ser subfracionada com o objetivo de identificar populações específicas de carboidratos que apresentassem, de forma mais potente, as propriedades já mencionadas.

A cromatografia de troca iônica foi realizada utilizando 50 mL (1 volume) da resina TSKgel DEAE-5PW (30 μ m), uma resina aniônica do tipo fraca. A resina foi ativada por eluição de 3 volumes com solução composta de 50 mM de $C_2H_3NaO_2$ e 1 M de NaCl e em pH 5,0, seguida da eluição de 10 volumes com solução composta apenas por 50 mM de $C_2H_3NaO_2$ e também em pH 5,0, ao término da ativação a F0,5v pode ser complexada à resina. Cerca de 1,3 g de F0,5v foi solubilizado 130 mL de solução 50 mM $C_2H_3NaO_2$ e pH 5,0, a mistura foi centrifugada para a remoção de partículas sólidas insolúveis e então aplicada na resina DEAE, para garantir o máximo de complexação os 130 mL contendo F0,5v foram eluídos na coluna três vezes. O protocolo de eluição utilizada foi o de “*step wise*”, cujas fases móveis foram soluções de 50 mM $C_2H_3NaO_2$, em pH 5,0 e contendo concentrações crescentes de NaCl: 0,2 M; 0,4 M; 0,5 M; 0,6 M e 1,0 M, de cada fase móvel foi eluída 3 volumes (150 mL). O fluxo de eluição da fase móvel foi de 1,2 mL/min durante todo o processo. Os compostos presentes nas diferentes eluições foram precipitados por adição de metanol, cerca de 300 mL de metanol foi adicionado a cada eluato e a mistura foram deixadas a 4 °C durante 18 h para que houvesse o máximo de precipitação, por fim, o material precipitado foi recuperado após centrifugação a 10000 g durante 30 min e o sobrenadante descartado.

3.13. Caracterização das subfrações de F0,5v

As subfrações de F0,5v foram caracterizadas por meio das mesmas análises utilizada nas na caracterização das frações cetônicas, descritas na seção 3.6.. Além disso, foram submetidas a cromatografia por gel filtrada para estimativa do tamanho molecular.

A dosagem de açúcares totais empregada na caracterização das subfrações foi realizada utilizando o padrão de açúcar a galactose, pois esse foi o açúcar presente em maior quantidade nessas subfrações. Quanto às outras quantificações todos os outros padrões utilizados foram os mesmos nos dois momentos.

3.13.1. Cromatografia líquida de exclusão molecular

O cromatógrafo utilizado foi o HPLC VWR-Hitachi LaChrom Elite® HPLC com um detector de índice de refração L-2490, ao qual estava acoplado a coluna Ultrahydrogel Waters 500 ® (Melo-Silveira *et al.*, 2012). A fase móvel utilizada foi solução com 0,1 M de nitrito de sódio e o fluxo das eluições foi de 1 mL/minuto, cada eluição teve duração de 12 minutos e em cada eluição foi aplicado 0,2 mg de amostra. Para estimar o tamanho molecular a partir dos tempos de retenção utilizamos uma curva de calibração formada com base nos tempos de retenção de padrões comerciais de dextrana de diferentes tamanhos: 6, 10, 40, 70, 270 e 500 kDa que foram adquiridos comercialmente na Sigma-Aldrich.

3.14. Quantificação de cálcio iônico

A concentração do cálcio iônico presente no sobrenadante da solução metaestável, após a remoção dos cristais CaOx, foi determinada por meio de reação colorimétrica utilizando solução de Arsenazo, constituída de 200 mM Arsenazo III, 100 mM MÊS pH 6,50 (Chutipongtanate e Thongboonkerd, 2010). O Arsenazo III forma complexos com íons de cálcio e com isso muda a coloração de vermelho para azul. Foi usado como padrão uma solução de cloreto de cálcio.

3.15. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Foram obtidos espectros de infravermelho dos cristais CaOx formados ausência ou presença de diferentes concentrações das frações cetônicas. Para a realização do ensaio foram feitas, por prensagem, pastilhas de KBr contendo cristais CaOx na proporção de; 10% de cristais CaOx e 90% de KBr (Gomes *et al.*, 2019). Os espectros foram obtidos com o uso do espectrômetro Shimadzu FTIR-8400S na faixa de comprimento de onda de 4000 cm - 400 cm⁻¹.

3.16. Capacidade antioxidante total

A capacidade total antioxidante da F0,5v e suas subfrações foi avaliada a partir da reação de redução do molibdênio⁺⁶ à molibdênio⁺⁵ (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

Resumidamente, 100 µg das amostras dissolvidas em 100 µL de água foram incubadas com 100 µL de solução contendo 40 mM molibdênio⁺⁶ de amônio e 6 M de ácido sulfúrico em microtubos de centrífuga, depois adicionou-se aos tubos 100 µL de solução de 280 mM de fosfato de sódio e completou-se o volume de cada tubo para 1 mL adicionando-se água destilada, os tubos foram então fechados e incubados a 100 °C de calor seco durante 90 minutos. Depois os tubos foram deixados para esfriar em temperatura ambiente por 30 minutos e a absorvância em 695 nm do material contido nos tubos foi medida. Os mesmos procedimentos citados foram adotados utilizando água destilada no lugar da amostra, o branco, e quantidades conhecidas de ácido ascórbico, o padrão, para fazer a curva de calibração.

O molibdênio⁺⁵ formado pela redução do molibdênio⁺⁶ reage com o fosfato de sódio e forma um complexo em meio ácido que tem coloração esverdeada, a qual é proporcional a absorvância em 695 nm, portanto quanto mais esverdeada a solução final mais houve redução do molibdênio e maior a capacidade antioxidante da amostra.

A equivalência de ácido ascórbico por grama de amostra foi calculada a partir da equação abaixo

$$\text{Equivalência de ácido ascórbico} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Cotangente da curva de calibração}} \times 10^4$$

3.17. Sequestro de radicais hidroxila

A capacidade da F0,5v e suas subfrações de sequestrar radicais hidroxila foi avaliada a partir da indução *in vitro* da reação de Fenton pela mistura de íons ferroso com peróxido de hidrogênio (Smirnoff e Cumbes, 1989). Brevemente, 200 µg das diferentes amostras, dissolvidas em 200 µL de água, foram misturadas com 600 µL de solução contendo 40 mM de sulfato ferroso (Fe²⁺), 8 mM de salicilato de sódio e 40 mM de EDTA, depois a mistura foi incubada com 200 µL de peróxido de hidrogênio 10% durante 60 minutos a 37 °C e analisada em leitor de microplaca no comprimento de onda de 510 nm. O branco e controle são os tubos que não receberam nenhuma amostra, porém o controle recebeu adição de peróxido de hidrogênio e o branco não.

A mistura de peróxido de hidrogênio e íons ferrosos induz a reação de Fenton que gera radicais hidroxila, os radicais hidroxila reagem com o salicilato de sódio e gerar uma coloração que é mensurada pela absorvância em 510 nm, caso a amostra seja capaz de sequestrar radicais hidroxila haverá menos radicais para reagir com o salicilato e consequentemente menor coloração.

O percentual de sequestro de radicais hidroxila foi determinado a partir da equação abaixo

$$\% \text{ de sequestro de HO} \cdot = \frac{\text{Abs do controle} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs do padrão} - \text{Abs do branco}} \times 100$$

3.18. Sequestro de radicais superóxido

A capacidade da F0,5v e suas subfrações de sequestrar radicais superóxido foi avaliada a partir da fotodegradação da riboflavina e redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Beauchamp e Fridovich, 1971; Dasgupta e De, 2007). Brevemente, diferentes massas das amostras testes (0,05 mg, 0,10 mg, 0,25 mg, e 0,50 mg) foram adicionadas aos tubos do teste num volume final de 200 µL de tampão fosfato (pH 7,4 e 50 mM), depois adicionou-se a todos os tubos na respectiva ordem: 200 µL de metionina (65 mM), 200 µL de EDTA (0,5 mM), 200 µL de NBT (0,375 mM) e 200 µL de riboflavina (0,5 mM), depois, com a exceção do branco, todos os tubos foram incubados durante 15 minutos sob luz forte e a absorbância em 560 nm de cada tudo foi lida em leitor de microplaca. O branco e controle são os tubos que não receberam nenhuma amostra, porém o controle foi exposto a luz e o branco não.

A riboflavina exposta à luz degrada-se e gera radicais superóxido, os quais quando não são sequestrados pela amostra teste reduzem o NBT à azul de formazan, logo a diminuição da coloração azul é indicativa de que menos NBT foi reduzido e que a amostra é capaz de sequestrar superóxido.

O percentual de sequestro foi calculado a partir da seguinte equação

$$\% \text{ de sequestro de } O_2^- = \frac{\text{Abs do controle} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs do padrão} - \text{Abs do branco}} \times 100$$

3.19. Sequestro de óxido nítrico

A capacidade de sequestro de óxido nítrico (NO)· foi avaliada a partir da fotodegradação do nitroprussiato de sódio (Nirala *et al.*, 2019). Sucintamente, 100 µg das diferentes amostras, solubilizadas em 100 µL de água destilada, foram dispostas nos poços de microplaca de 96 poços, depois adicionou-se 100 µL de solução de 6 mM de nitroprussiato de sódio em todos os poços, após isso a placa foi incubada durante 30 minutos sob luz forte.

Após a incubação uma alíquota de 50 µL de cada um dos poços foi transferida para uma nova microplaca de 96 poços e misturada com 50 µL de reagente de Griess (0,2% de dicloridrato de naftiletilenodiamina e 2% de sulfonamida em 5% de ácido fosfórico), a segunda microplaca foi analisada em leitor de microplaca na absorbância de 546 nm. Os mesmos procedimentos citados foram adotados utilizando água destilada no lugar da amostra para a obtenção do branco.

O nitroprussiato de sódio sofre fotodegradação e libera óxido nítrico, quando o óxido nítrico não é sequestrado pela amostra ele reage com a água e forma nitrato, que na presença do reagente de Griess na segunda placa tem forma coloração rosada, logo a diminuição da coloração rosada é indicativo que menos nitrato foi formado e que a amostra é capaz de sequestrar óxido nítrico.

O percentual de sequestro do óxido nítrico foi determinado pela seguinte reação

$$\% \text{ de sequestro de NO} \cdot = 1 - \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs do branco}} \times 100$$

3.20. Cultivo celular

Durante todos os experimentos, as células foram cultivadas em atmosfera de 5% de CO₂ e 37 °C e em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado ou não com 10% de soro fetal bovino (SFB), o qual foi trocado regularmente a cada 72 h para evitar o acúmulo de substâncias tóxicas e a falta de nutrientes. As células MDCK são aderentes e por isso foram cultivados em garrafas plásticas produzidas pela Corning® com tratamento especializado para a aderência das células, a cada seis dias as células foram subcultivadas, ou seja, removidas das garrafas pela ação de solução contendo tripsina e EDTA e então transferidas para uma nova garrafa, esse procedimento visa reduzir o excesso de excretadas que costumam ficar aderidas à garrafa.

3.21. Ensaio de redução do brometo de tetrazólio azul de tiazol (MTT) em células MDCK

O ensaio de redução do MTT é um método que mensura a viabilidade e o metabolismo celular e é amplamente utilizado para avaliar a toxicidade de diversos compostos (Mosmann, 1983). O princípio do ensaio é a redução do MTT, que é solúvel, a cristais de formazan, que são insolúveis, a reação de redução do MTT consome NADPH e é catalisada por redutases mitocondriais, por isso a quantidade final de cristais de formazan reflete indiretamente o metabolismo mitocondrial e o balanço oxidativo. Os procedimentos para a realização do ensaio de redução do MTT serão divididos em quatro etapas para facilitar o entendimento.

Na primeira etapa as células foram removidas das garrafas de cultivo com o auxílio de tripsina/EDTA, comprada da Sigma-Aldrich, e dispostas em placa de 96 poços de forma que em cada poço fossem dispostas exatamente 4x10³ células. As células foram deixadas em condições de cultivo e em meio suplementado com SFB durante 24 h para que aderissem à superfície das placas

Na segunda etapa, o meio de cultivo presente nas placas de 96 poços foi substituído por meio sem suplementação com SFB, as células foram deixadas nessa nova condição durante 18 h. Na ausência de SFB as células não iniciam a multiplicação celular e ficam sincronizadas em G₀.

A terceira etapa corresponde ao tratamento e por isso é variado, em todos os aspectos, de acordo com o objetivo final do ensaio. Geralmente são empregados tratamentos que visam simular determinadas situações e avaliar como as células respondem

A última etapa corresponde ao ensaio de redução do MTT propriamente dito, nessa etapa o meio de cultivo foi removido e substituído por meio contendo o MTT na concentração de 1 mg/mL, as células foram incubadas nessas condições durante 4 h. Durante esse período

as células reduzem o MTT a formazan de acordo com sua atividade metabólica e antioxidante. Determinadas as 4 h de incubação, o meio contendo MTT foi removido e os cristais de formazan presentes nos poços foram solubilizados pela adição de etanol absoluto, a absorbância em 570 nm de cada poço foi avaliada por meio de leitor de microplaca.

O formazan solubilizado em etanol tem coloração arroxeada, cuja intensidade é diretamente proporcional à quantidade de formação e indiretamente proporcional a viabilidade celular.

3.21.1. Avaliação da toxicidade da fração F0,5v em células MDCK

A toxicidade da F0,5v em células MDCK foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT. Brevemente, as células foram preparadas para o ensaio conforme descrito anteriormente e então incubadas durante 24 h com meio de cultivo contendo uma das seguintes concentrações de F0,5v: 0,03125 mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, exceto o grupo controle, o qual foi incubado apenas com meio de cultura (Mendes Marques *et al.*, 2019).

A absorbância de cada poço foi mensurada e normalizada de acordo com a absorbância dos poços referentes ao grupo controle, assumindo que o grupo controle representa 100% de viabilidade celular. Com isso a viabilidade celular das células contidas em cada poço foi determinada pela seguinte equação:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorbância\ do\ poço}{Absorbância\ média\ do\ controle} \times 100$$

Foram realizados três experimentos independente e em quintuplicatas, cinco poços para cada condição de tratamento.

3.21.2. Avaliação do potencial da F0,5v na mitigação do dano oxidativo em células MDCK

Uma situação de dano oxidativo a nível celular foi induzido pela adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ao meio de cultura das células MDCK, e com o objetivo de avaliar se o tratamento prévio, efeito profilático, o tratamento posterior, efeito regenerativo, ou o tratamento concomitante ao peróxido de hidrogênio com diferentes concentrações de F0,5v seria capaz de mitigar o dano oxidativo causado nas células (Wang *et al.*, 2015). A intensidade do dano oxidativo sofrido pelas células foi estimado com base na viabilidade celular, determinada pelo ensaio de redução do MTT.

As células foram preparadas para o ensaio conforme descrito anteriormente e então incubadas durante 1 h com meio de cultivo contendo 2 mM de H₂O₂, exceto para o grupo controle negativo, e diferentes concentrações de F0,5v, exceto para o grupo controle positivo. Após o período determinado o meio de cultura foi substituído por um meio de cultivo sem

peróxido e/ou F0,5v e suplementado com SFB, as células foram mantidas nessa condição por 24 h, para que pudesse restaurar suas atividades metabólicas após o estresse.

O grupo controle negativo foi considerado como 100% de viabilidade celular, e partir dos valores de desse grupo determinou-se a viabilidade celular presente nos outros poços por meio da equação à baixo.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Abs\ do\ poço}{Abs\ média\ do\ controle\ negativo} \times 100$$

Foram realizados três experimentos independentes e em quintuplicatas, cinco poços para cada condição de tratamento. Comparando a viabilidade celular encontrada no controle positivo com as células que foram tratadas com a F0,5v foi possível avaliar o efeito da adição de F0,5v na mitigação do dano oxidativo.

3.22. Análise estatística

Para cada ensaio foi realizado três experimentos independentes e os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de comparação de médias de Dunnett ($p < 0,05$) para determinar diferenças significativas entre as amostras testadas. O programa utilizado nas análises estatísticas foi o GraphPadPrism versão 6,0,1, setembro de 2012 (California, Estados Unidos).

4. Resultados

4.1. Extração das frações cetônicas e o rendimento obtido

Cinco frações cetônicas foram obtidas a partir do extrato bruto por precipitação com acetona e posterior centrifugação e secagem a vácuo. A massa de cada fração cetônica seca foi determinada por pesagem. O rendimento relativo do processo de fracionamento foi calculado comparando-se as massas das frações entre si e o rendimento em relação a massa de alga seca foi calculado comparando-se a massa obtida de cada fração com a massa de alga seca (Tabela 2).

Tabela 2 - Rendimentos do fracionamento com acetona do extrato bruto obtido a partir alga *D. delicatula*. Determinou-se tanto o rendimento relativo entre as frações como o rendimento em relação a massa de alga seca.

Fração cetônica	Rendimento* relativo (%)	Rendimento em relação a massa de alga seca (mg de fração cetônica/g de alga seca)
F0,5v	30,7	7,4
F0,7v	37,9	9,1
F1,0v	8,0	1,9
F1,5v	7,9	1,9
F2,0v	15,5	3,7

* A soma da massa de todas as frações foi considerada 100%

Os maiores rendimentos foram os obtidos com as frações F0,5v e F0,7v, a soma das massas obtidas dessas duas representaram quase 70% do total de material obtido. Os menores rendimentos foram obtidos com F1,0v e F1,5v, juntos esses dois rendimentos não representaram nem 20% do total de material obtido, por fim, o rendimento obtido com F2,0v foi, em relação aos citados anteriormente, intermediário, representando 15,5% do total de material obtido.

4.2. Caracterização físico-química das frações cetônicas

A caracterização das frações cetônicas foi realizada por meio de: quantificação de açúcares totais, compostos fenólicos, proteínas e sulfato (Tabela 3); eletroforese em gel de agarose (Figura 14); e determinação da composição monossacarídica (Tabela 4).

4.2.1. Determinação da composição química das frações cetônicas

O percentual de cada um dos componentes (açúcar, proteínas, compostos fenólicos e sulfato) presente nas frações cetônicas foi determinado a partir dos diversos ensaios de quantificação. Os dados correspondentes às quantificações químicas realizadas estão sumarizados na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Teor de açúcares, proteínas, compostos fenólicos e sulfato das frações obtidas pelo processo de extração proteolítica seguido de fracionamento por adição seriada de acetona

Fração	Açúcar total (%)	Fenólicos (%)	Proteínas (%)	Sulfato (%)
F0,5v	65 ± 1,5	<1	<1	4,6 ± 0,9
F0,7v	70,3 ± 1,5	<1	<1	10,4 ± 1,9
F1,0v	82,1 ± 2,0	<1	<1	15,6 ± -,8
F1,5v	55,7 ± 1,2	<1	<1	21,5 ± 1,4
F2,0v	49,8 ± 1,3	<1	<1	6,9 ± 0,1

Ao se observar a Tabela 3 fica evidente que as frações são constituídas principalmente por carboidrato, já que os percentuais de açúcar apresentados variaram entre 49.8%, na fração F2,0v, e 82.1%, na fração F1,0v. Durante a leitura da Tabela 3 observa-se que todas as frações cetônicas possuem sulfato em sua composição, e que o percentual de sulfato nas frações cetônicas variou de 4,6%, na fração F0,5v, até 21,5%, na fração F1,5v.

Diante desses dois dados citados anteriormente, as frações cetônicas também passarão a ser denominadas, a partir desse ponto do texto, de frações ricas em polissacarídeos sulfatados.

Não se detectou quantidade igual ou maior que 1% de proteínas ou compostos fenólicos em nenhuma das frações analisadas.

4.2.2. Eletroforese em gel de agarose das frações cetônicas

As frações ricas em polissacarídeos sulfatados foram caracterizadas também por meio de eletroforese em gel de agarose. Todo o processo foi repetido três vezes e de forma independente. As lâminas de eletroforese foram submetidas a corrida eletroforética, postas para precipitar e então coradas por imersão das lâminas em solução de azul de toluidina 0,1% (m/v). Após a coloração foi possível observar coloração azul-arroxeadada (metacromasia) em todas as bandas correspondentes às frações cetônicas, uma das lâminas está exposta a seguir de forma representativa (Figura 14).

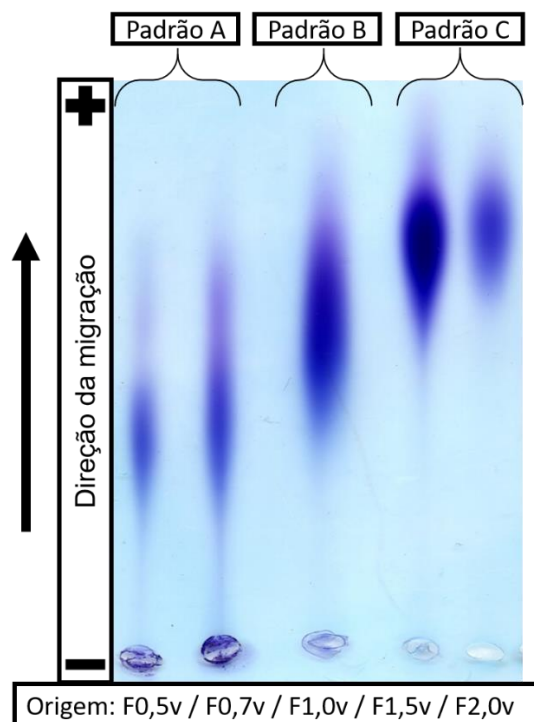


Figura 14. Imagem da lâmina eletroforese contendo as frações cetônicas obtidas na extração/precipitação. A metacromasia observada é resultado da coloração por azul de toluidina. Padrões A, B, C estão assinalados de acordo perfil da migração

Foram identificados três diferentes padrões de migração eletroforética; padrão de baixa migração (Padrão A), que foi visto nas bandas referente às frações F0,5v e F0,7v; padrão de média migração (Padrão B), observado na banda referente a fração F1,0v e padrão de alta migração (Padrão C), observado nas bandas referentes às frações F1,5v e F2,0v.

4.2.3. Determinação da composição monossacarídica das frações cetônicas

Os polissacarídeos presentes nas frações cetônicas foram completamente hidrolisados e os monossacarídeos liberados foram quantificados por meio da análise de HPLC, a partir da qual foi possível determinar a razão molar e o percentual de cada monossacarídeo nas frações cetônicas, como mostrado na Tabela 4. Detectou-se nas frações cetônicas a presença significativa dos seis monossacarídeos seguintes: ácido glucurônico, galactose, glucose, manose, xilose e fucose.

Tabela 4 - Razão molar e percentual entre os monossacarídeos presentes nas frações cetônicas.

Fração cetônica	GlcA*	Galactose	Glicose	Manose	Xilose	Fucose
F0,5v	1,3 (15%)	1,7 (20%)	3,8 (45%)	0,1 (1%)	0,6 (7%)	1 (12%)
F0,7v	2,6 (16%)	3,4 (21%)	1,4 (9%)	1,2 (8%)	6,3 (40%)	1 (6%)
F1,0v	0,7 (11%)	2,3 (36%)	0,9 (14%)	0,8 (12%)	0,7 (11%)	1 (16%)
F1,5v	0,1 (3%)	2,5 (55%)	0,5 (10%)	0,1 (1%)	0,4 (8%)	1 (22%)
F2,0v	0,1 (2%)	1,0 (28%)	0,6 (18%)	0,2 (6%)	0,6 (17%)	1 (29%)

* Ácido glucurônico

Identificou-se quantidades significativas de ácido glucurônico nas frações cetônicas F0,5v, F0,7v e F1,0v, enquanto F1,5v e F2,0v apenas se observou traços deste monossacarídeo. A galactose esteve presente em todas as frações cetônicas em grandes quantidades, variando de 20%, para F0,5v, até 55% para a F1,5v. A glicose também foi identificada como componente de todas das frações, porém em menor quantidade que a galactose, o percentual de glicose variou de 9%, para a F0,7v, até 25%, para a F0,5v.

Apenas na F0,7v e F1,0v detectou-se quantidades significativas de manose, em todas as outras frações cetônicas observaram-se apenas traços deste monossacarídeo. A xilose foi identificada como açúcar majoritário da F0,7v e, quando comparada com as demais frações, esteve presente em grandes quantidades, na F2,0v e F1,0v, 17% e 11% respectivamente. Porém, na F0,5v e na F1,5v, apenas traços deste açúcar foram observados. Quantidades maiores de fucose foram encontradas nas frações F1,5v, 22%, e F2,0v, 29%, enquanto nas frações F0,5v; F0,7v e F1,0v identificou-se menor presença desse açúcar, variando de 6%, em F0,7v, até 16%, em F1,0v.

4.3. Análise de efeito modulador das diferentes frações cetônicas no processo de cristalização do oxalato de cálcio

A cristalização do CaOx ocorreu na presença ou ausência de cada uma das frações cetônicas obtidas a partir da *D. delicatula* na concentração de 0,10 mg/mL e foi induzida pela formação de soluções supersaturada de oxalato e cálcio, depois os cristais foram colhidos por centrifugação e postos em placas de 24 poços para que fossem obtidas imagens dos cristais. Na Figura 15 está demonstrado exemplos das imagens que foram utilizadas na contagem, medição e diferenciação dos cristais.

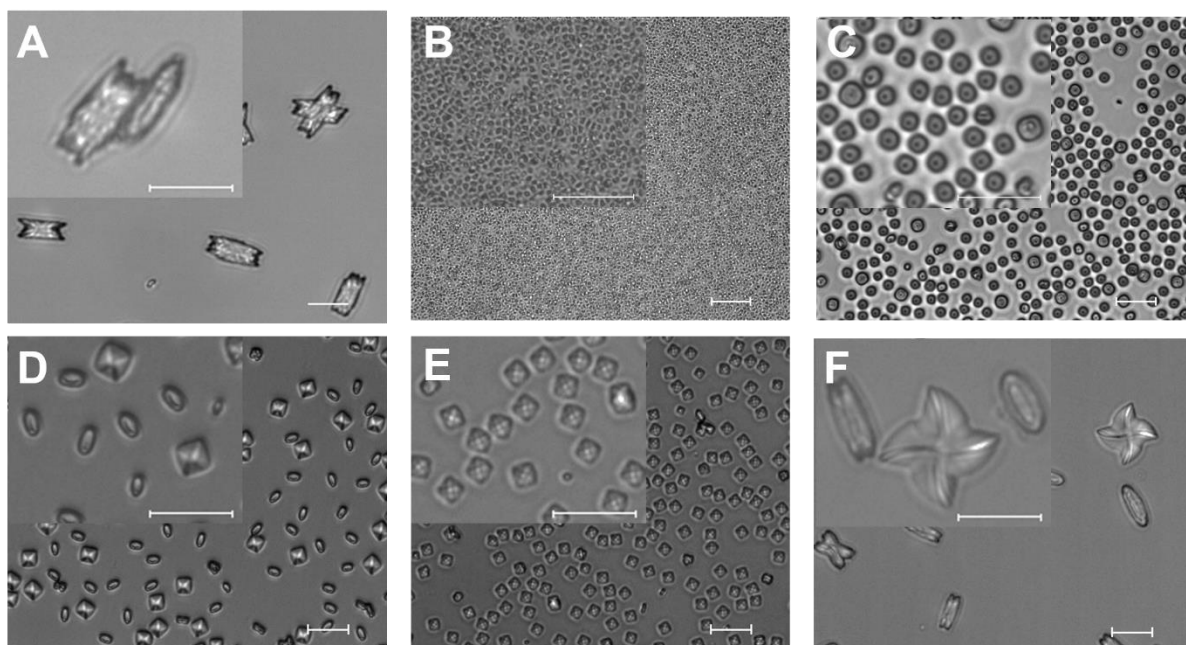


Figura 15. Cristais de CaOx observados por microscopia óptica nos aumentos de 200x (imagem maior) e 600x (imagem menor). Os cristais foram formados na ausência (A) ou presença de 0,1 mg/mL de F0,5v (B), F0,7v (C) F1,0v (D), F1,5v (E) ou F2,0v (F). Os cristais de formas retangulares foram classificados como COM e os de forma bipiramidal como COD. A escala (barra branca no canto inferior direito) representa, em todas as imagens, o comprimento de 20 μm

Nota-se, numa análise superficial, que todas as frações cetônicas foram capazes de modificar, em diferentes formas e graus, a morfologia dos cristais CaOx formados.

A utilização de imagens se deu em dois aumentos diferentes (200x e 600x) para que fosse possível uma visão representativa tanto dos cristais de menor tamanho como de maior tamanho.

A contagem e a medição dos cristais foram realizadas manualmente e as médias dos números de cristais e o tamanho médio dos cristais estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados referentes à contagem média e diferenciação dos cristais formados na ausência ou presença de cada uma das diferentes frações cetônicas

Fração	N° de cristais por imagem (normalizado pelo controle)	Percentual de CODs	Tamanho dos CODs (μm)	Comprimento dos COMs (μm)
Controle	1 ^a	8,9%	19,82 \pm 1,35 ^a	22,06 \pm 0,97 ^a
F0,5v	1721,0 \pm 177,6 ^b	100,00%	1,08 \pm 0,18 ^b	N/A [†]
F0,7v	74,1 \pm 27,3 ^c	100,00%	6,15 \pm 0,62 ^c	N/A [†]
F1,0v	43,6 \pm 15,4 ^{acde}	40,66%	8,05 \pm 0,44 ^d	6,0 \pm 0,35 ^b
F1,5v	64,5 \pm 4,6 ^{cd}	100,00%	5,51 \pm 0,31 ^{ce}	N/A [†]
F2,0v	2,1 \pm 0,6 ^{ae}	9,01%	18,87 \pm 3,02 ^f	18,7 \pm 1,97 ^c

Os números apresentados são referentes a contagens feitas a partir de imagens obtidas por microscopia óptica. Devido à ausência de cristais do tipo COM não foi possível realizar as medições de comprimento em alguns grupos e por isso estão marcados com N/A. Grupos que apresentam a mesma letra^{abcdef} são estatisticamente iguais.

No grupo controle foram contados, em média, 114 cristais por imagem obtida, esse valor foi então utilizado para normalizar todas as outras contagens de cristais e facilitar a compreensão dos resultados.

A presença das frações cetônicas aumentou o número de cristais formados. Destaca-se nesse aspecto a F0,5v, cuja presença aumentou em média em 1721 vezes o número de cristais contados por imagem quando comparado com o grupo controle. Outras frações cetônicas também promoveram aumentos no número de cristais contados, os valores variaram entre 43,6 (F1,0v) e 74,1 vezes (F0,7v) mais cristais que o controle. A presença da F2,0v foi a que teve o menor efeito em relação à modificação no número de cristais por imagem, porém mesmo assim aumentou em 2,1 vezes o número de cristais em relação ao controle.

Em relação à classificação dos cristais em COM e COD, com base na morfologia, identificou-se que 8,9% dos cristais do grupo controle se incluem em cristais do tipo COD. Esse valor de percentual não se modificou quando houve a adição da F2,0v no processo de cristalização. Por outro lado, a adição da F1,0v promoveu mudanças no tipo dos cristais, fazendo com que 41% dos cristais formados na presença dessa fração fossem classificados como COD. Contudo, as maiores alterações no tipo dos cristais foram as promovidas pela adição das frações F0,5v; F0,7v e F1,5v, pois quando na presença de cada uma delas todos os cristais formados foram classificados como COD.

O comprimento dos COMs e o tamanho dos CODs formados na ausência de qualquer fração foram de 22,06 μm e 19,82 μm , respectivamente. Quando houve adição de qualquer uma das frações cetônicas tanto o comprimento dos COMs como o tamanho dos CODs foram

menores do que os observados nas imagens do grupo controle, porém vale destacar que apesar da presença da F2,0v ter reduzido as medidas de comprimento e tamanho dos cristais os valores obtidos na presença da fração não foram estatisticamente diferentes dos obtidos no grupo controle. Não foi possível realizar a medição do comprimento dos COMs nas imagens referentes as frações: F0,5v; F0,7v; F1,5v devido à ausência desse tipo de cristal nas imagens.

Quanto à redução no tamanho dos cristais, mais uma vez destaca-se a fração F0,5v, cuja presença na formação dos cristais resultou em cristais CODs com tamanho de 1,08 µm em média. Já na presença das frações F0,7v; F1,0v ou F1,5v os valores medidos de tamanho dos CODs foi de 6,15 µm; 8,05 µm e 5,51 µm, respectivamente.

Quanto ao comprimento dos cristais COM, a presença das frações cetônicas F1,0v e F2,0v resultou em cristais COM com comprimento de 6,15 µm e 18,87 µm, respectivamente.

4.4. Análise do potencial zeta dos cristais de CaOx

A estabilidade ou tendência a agregação de partículas dispersas podem ser preditas pela medição do potencial zeta destas. Portanto, sendo a agregação de cristais CaOx objeto de estudo deste trabalho, determinou-se o potencial zeta dos cristais de CaOx formados na presença ou ausência de diferentes frações cetônicas e os valores são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Médias e desvio padrão do potencial zeta dos cristais de CaOx formados na presença ou ausência de diferentes frações cetônicas na concentração de 0,10 mg/mL

Fração	Potencial zeta do cristal CaOx (mV)
Controle	-7 ± 1 ^a
F0,5v	-35 ± 11 ^b
F0,7v	-44 ± 7 ^{bc}
F1,0v	-45 ± 3 ^c
F1,5v	-51 ± 11 ^c
F2,0v	-44 ± 4 ^{bc}

Grupos que apresentam a mesma letra ^{abcdef} são estatisticamente iguais.

A presença das frações cetônicas na cristalização resultou no aumento da carga negativa na superfície dos cristais formados. Porém, apesar de serem semelhantes houve diferenças na intensidade da carga negativa entre os cristais formados na presença das diferentes frações cetônicas. A fração que menos alterou o potencial zeta foi a F0,5v, cuja presença resultou em cristais com carga superficial média de -35 mV, enquanto a F1,5v foi a

fração que mais alterou o potencial zeta, na presença desta fração os cristais formados apresentaram carga superficial de -51 mV.

4.5. Análises por microscopia óptica do efeito modulador de cristalização de diferentes concentrações de F0,5v

Ao analisar os resultados obtidos até este ponto percebeu-se que o efeito da adição da F0,5v promove as maiores alterações na cristalização do CaOx, por isso avaliou-se mais detalhadamente a atividade moduladora dessa fração. Avaliando-se inicialmente a influência da redução da concentração da F0,5v sobre o efeito modulador.

Os efeitos da adição de diferentes concentrações da F0,5v foram avaliados utilizando o mesmo método e parâmetros já descritos anteriormente no item 3.8. Foram obtidas imagens dos cristais formados na presença ou ausência da F0,5v em diferentes concentrações (Figura 16).

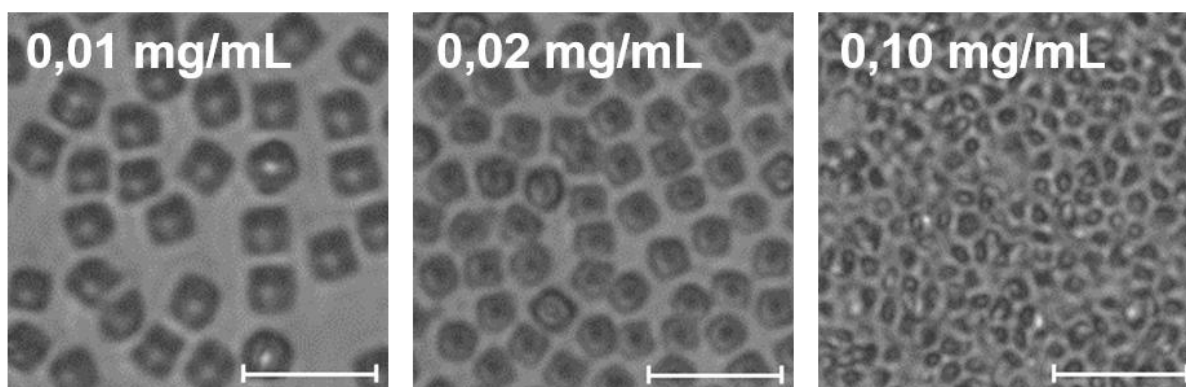


Figura 16. CaOx observados por microscopia óptica nos aumentos de 600x. Os cristais foram formados na presença de diferentes concentrações de F0,5v, conforme assinalado em cada figura. Os cristais de formas retangulares foram classificados como COM e os de forma bipiramidal como COD.

A análise das imagens dos cristais formados na presença de diferentes concentrações de F0,5v revela que as diferenças entre os cristais se limitam ao número e tamanho dos cristais e não alteram a proporção entre as faces, pois a morfologia bipiramidal está presente em todas as imagens obtidas em que é possível diferenciar a morfologia.

As imagens foram utilizadas para realizar a contagem e medição dos cristais, cujos dados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados referentes à contagem e diferenciação dos cristais formados na ausência ou presença de diferentes concentrações de F0,5v.

Fração	Nº de cristais normalizado pelo controle	Percentual de CODs*	Tamanho dos CODs (µm)	Comprimento dos COMs (µm)
Controle	1 ^a	8,87%	20,55 ± 1,75 ^a	23,09 ± 1,44
F0,5v (0,01 mg/mL)	221,2 ± 121,3 ^b	100,00%	3,40 ± 0,20 ^b	N/A
F0,5v (0,02 mg/mL)	238,7 ± 210,1 ^b	100,00%	2,59 ± 0,20 ^c	N/A
F0,5v (0,10 mg/mL)	1569,6 ± 161,9 ^c	100,00%	1,21 ± 0,23 ^d	N/A

Os números apresentados são referentes às contagens feitas a partir de imagens obtidas por microscopia óptica. Devido à ausência de cristais do tipo COM não foi possível realizar as medições de comprimento e por isso estão marcados com N/A.

Assim como no experimento anterior, o percentual cristais formados no grupo controle que foram classificados como COD foi menor que 10% e o tamanho dos CODs e comprimento dos COMs foi maior que 20 µm, o que corrobora com a reprodutibilidade do experimento realizado.

Os efeitos de aumento no número de cristais, redução do tamanho de CODs e aumento do percentual de CODs quando na presença da F0,5v já foram descritos nos experimentos anteriores, entretanto neste experimento, foi possível identificar esse efeito com uso de concentrações menores.

A presença de F0,5v na concentração de 0,01 e 0,02 mg/mL promoveu um aumento do número de cristais em 221 e 238 vezes, respectivamente, em relação ao número de cristais do grupo controle. Já quanto ao tamanho/comprimento houve uma redução nos cristais CODs, que foi de 20,55 µm, nos cristais do grupo controle, para 3,40 µm e 2,59 µm nos cristais formados na presença de 0,01 e 0,02 mg/mL de F0,5v, respectivamente. A presença de F0,5v na concentração 0,10 mg/mL levou a um aumento no número de cristais de 1569 vezes e uma redução no tamanho de CODs para 1,21 µm, contudo em relação a capacidade de aumentar o percentual de cristais CODs não houve diferença quanto às concentrações testadas, pois em todos os casos o percentual de CODs foi de 100%.

4.6. Quantificação do cálcio livre ao término da cristalização do CaOx

A concentração de cálcio na solução é reflexo do processo de cristalização do CaOx, por isso quantificou-se o cálcio das soluções em que a cristalização ocorreu em diferentes concentrações de F0,5v como também na ausência de qualquer aditivo, controle (Figura 17).

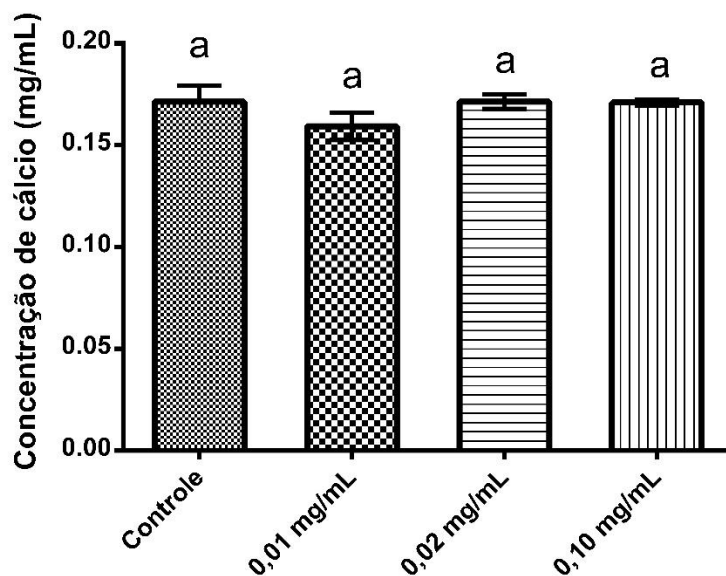


Figura 17. Gráfico exibindo os resultados da quantificação de cálcio no sobrenadante das soluções após o fim da cristalização. Barras com a letra “a” acima não são estatisticamente diferentes do controle e barras com a letra “b” acima são estatisticamente diferentes.

A adição de F0,5v, em nenhuma das concentrações testadas, causou alterações estatisticamente significativas na quantidade de cálcio presente no sobrenadante resultante da solução metaestável após o processo de cristalização do CaOx

4.7. Análise dos cristais CaOx por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A diferenciação do cristal de CaOx em COM e COD pode ser feita também por análise morfológica, porém é desejável que essa seja também realizada por meio de outro método. Assim, os cristais formados na presença das amostras, bem como, aqueles formados no grupo controle foram também avaliados por FTIR. Na Figura 18, tem-se os espectros de infravermelho obtidos com os cristais.

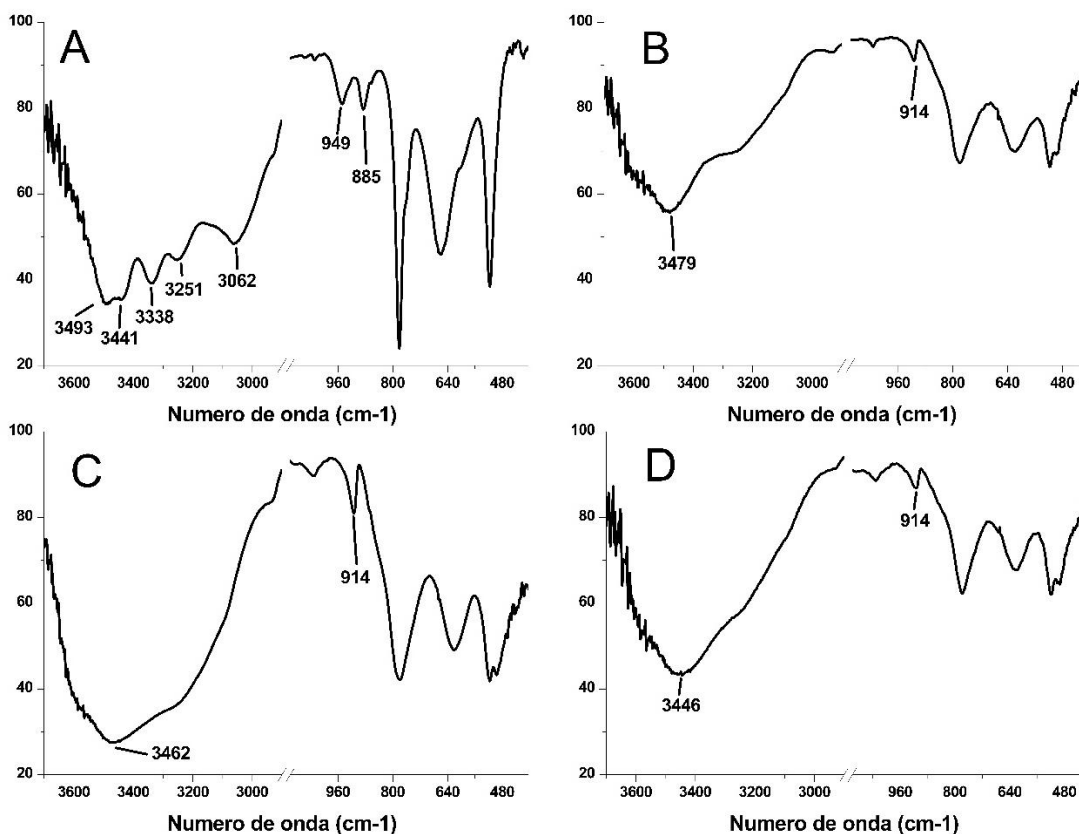


Figura 18. Espectros de FTIR dos cristais CaOx formados na ausência de F0,5v (A), ou presença de 0,01 mg/mL (B), 0,02 mg/mL (C) e 0,10 mg/mL (D) de F0,5v. cm^{-1}

Na Figura 18A é demonstrado um dos espectros obtidos com os cristais do grupo controle. Nele observa-se duas características clássicas de cristais COM, as cinco bandas distintas na região: 3493, 3441, 3338, 3251 e 3062 cm^{-1} e as bandas na região de 949 e 885 cm^{-1} , enquanto a banda característica de COD, que é na região de 914 cm^{-1} , não foi observada.

Já os espectros B, C e D foram obtidas com cristais formados na presença de diferentes concentrações de F0,5v, a saber: 0,01; 0,02 e 0,10 mg/mL, respectivamente. Observa-se que, independentemente da concentração, as bandas de cristais COM não são visíveis. Por outro lado, observa-se a presença de bandas características de cristas COD: uma banda difusa na região entre 3500 e 3000 cm^{-1} e uma outra banda na região de 914 cm^{-1} .

1.

4.8. Avaliação individualizada da nucleação, da agregação e da sedimentação dos cristais CaOx

A partir da medição periódica da absorbância em 620 nm foi possível traçar um perfil de cristalização na ausência e na presença das amostras. Esse perfil é mostrado na Figura 19.

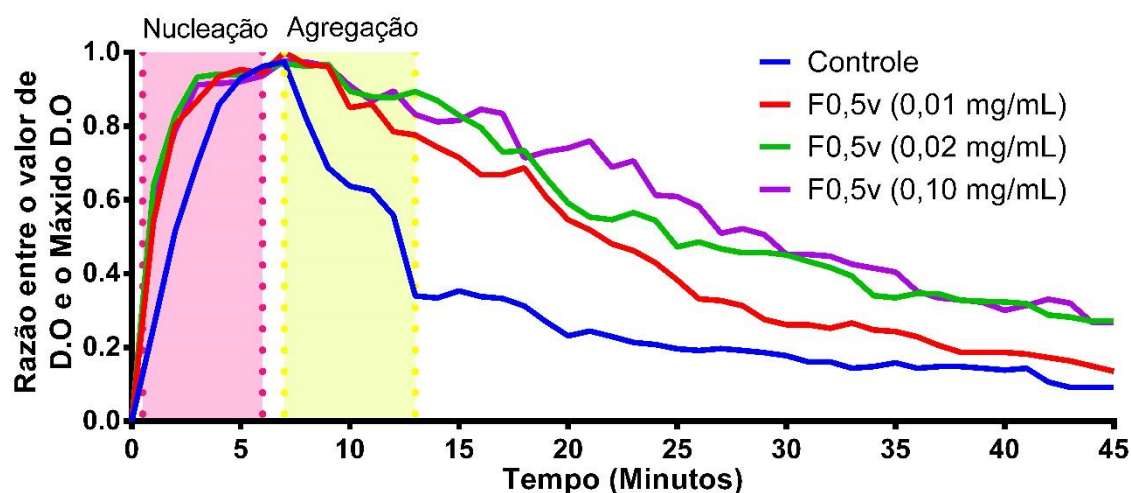


Figura 19. Gráfico representando o efeito da presença de F0,5v em diferentes concentrações nos valores de absorbância no decorrer do tempo. Os valores de absorbâncias de cada uma das curvas foi dividido pelo AbsMax da respectiva curva e expostos em razão entre o valor de absorbância de cada leitura e o valor de absorbância máximo.

No grupo controle a absorbância da solução após o início da cristalização aumentou de 0% a 51,57% nos dois primeiros minutos, e continuou aumentando até que se atingiu a absorbância máxima, 0,049 (AbsMax), no sexto minuto. Depois houve uma redução na absorbância de 63,48% entre os minutos sete e 13. Após isso, a absorbância continuou diminuindo, mas agora lentamente e vai de 33,41% no minuto 14 até 9,23% no minuto 45, uma redução de 24,18%. Cada uma das modificações na absorbância em 620 nm citadas anteriormente representa uma etapa da cristalização, a primeira representa a nucleação, a segunda a agregação e a última a sedimentação, quanto maior a variação de absorbância na nucleação ou agregação mais intenso foi o referido processo de cristalização.

Quando a F0,5v foi adicionada à solução metaestável de CaOx todas as etapas da cristalização foram alteradas. Porém, o perfil geral de aumento inicial da absorbância seguido de uma redução foi mantido. O aumento da absorbância entre os minutos zero e dois da cristalização foi de 80,37%, 82,80% e 78,9%, na presença de 0,01; 0,02 e 0,10 mg/mL de F0,5v, respectivamente, depois a absorbância continuou subindo até atingir o AbsMax, que foi de 0,107, 0,120 e 0,126 na presença de 0,01; 0,02 e 0,10 mg/mL de F0,5v, respectivamente. A redução de absorbância entre os minutos 7 e 13, agregação na presença de F0,5v nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,10 mg/mL foi de 22,43%, 9,22% e 8,20%,

respectivamente, e a redução na absorvância entre os minutos 14 e 45 na presença de F0,5v nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,10 mg/mL foi de 61,25%, 59,65% e 54,50%, respectivamente.

4.9. Avaliação das alterações na capacidade de células MDCK reduzirem o MTT após tratamento com F0,5v

Células MDCK foram tratadas com diferentes concentrações de F0,5v por 24 h e depois foram submetidas ao ensaio de redução do MTT. A partir da normalização dos valores de redução do MTT dos grupos tratados com os valores do grupo controle, que foi considerado como 100%, foi possível determinar os percentuais de redução MTT (Figura 20).

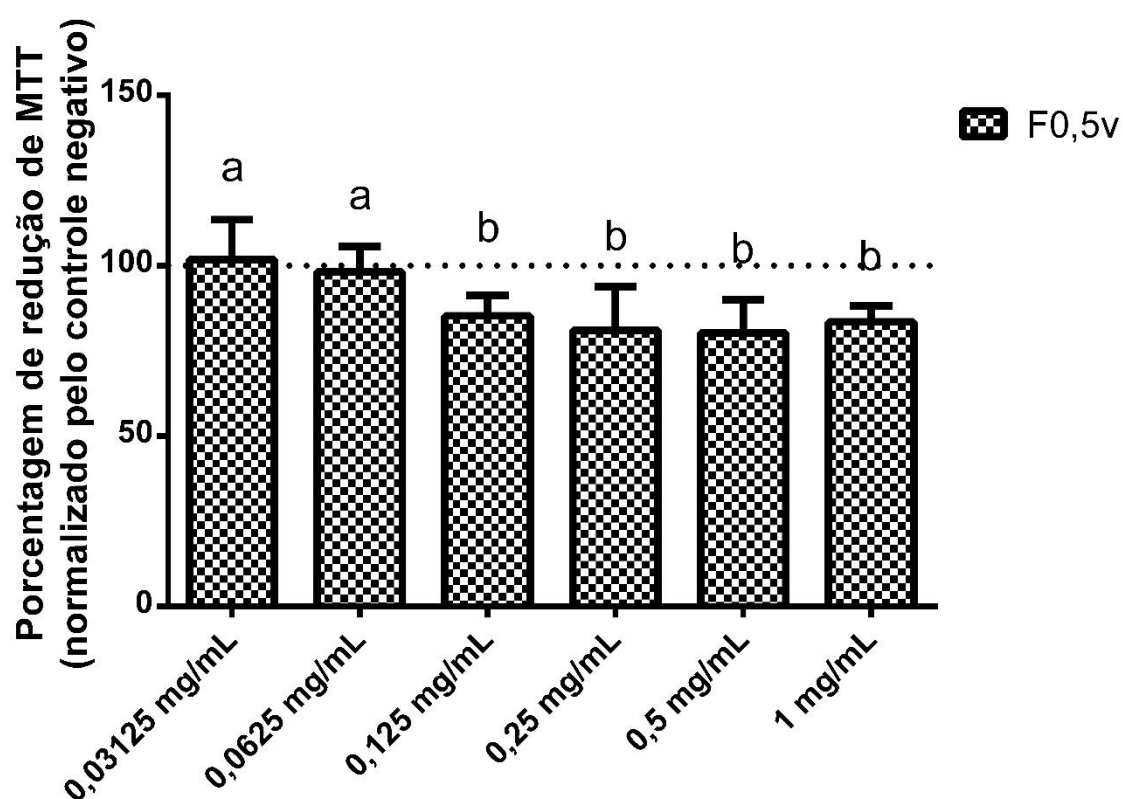


Figura 20. Percentual de redução do MTT das células MDCK após tratamento com diferentes concentrações de F0,5v por 24 h. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. O percentual de redução do MTT foi determinado considerando o controle negativo como “100%” de redução. Barras com a letra “a” acima não são estatisticamente diferentes do controle negativo e barras com a letra “b” acima são estatisticamente diferentes.

A exposição das células MDCK à F0,5v nas concentrações 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL alterou significativamente ($p < 0,05$) a capacidade das células em reduzir o MTT, reduzindo-a em cerca de 20%. Já quando as células foram expostas às concentrações menores, 0,0625 mg/mL e 0,03125 mg/mL, não houve alteração na capacidade de reduzir o MTT.

4.10. Avaliação do potencial da F0,5v em mitigar os danos causados em célula MDCK expostas ao peróxido de hidrogênio

A exposição de células ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um modelo capaz de mimetizar uma situação de estresse oxidativo sofrido pelas células dentro de um organismo, portanto foi utilizado para verificar se a F0,5v apresenta efeito antioxidante sob condições mais semelhante às fisiológicas. Três diferentes situações foram propostas e avaliadas, variando quanto a ordem entre agente estressor e antioxidante, são elas: efeito profilático, efeito protetor e efeito regenerativo.

4.10.1. Efeito profilático

As células MDCK tratadas com diferentes concentrações de F0,5v por 24 h foram expostas ao H_2O_2 e depois a sua capacidade de reduzir o MTT foi avaliada. O percentual de redução do MTT dos grupos que foram tratados com H_2O_2 e F0,5v ou só H_2O_2 foi calculado a partir da comparação com o valor de redução do MTT do grupo controle negativo, ao qual se atribui o percentual de 100%. Na Figura 21 resume-se os dados obtidos.

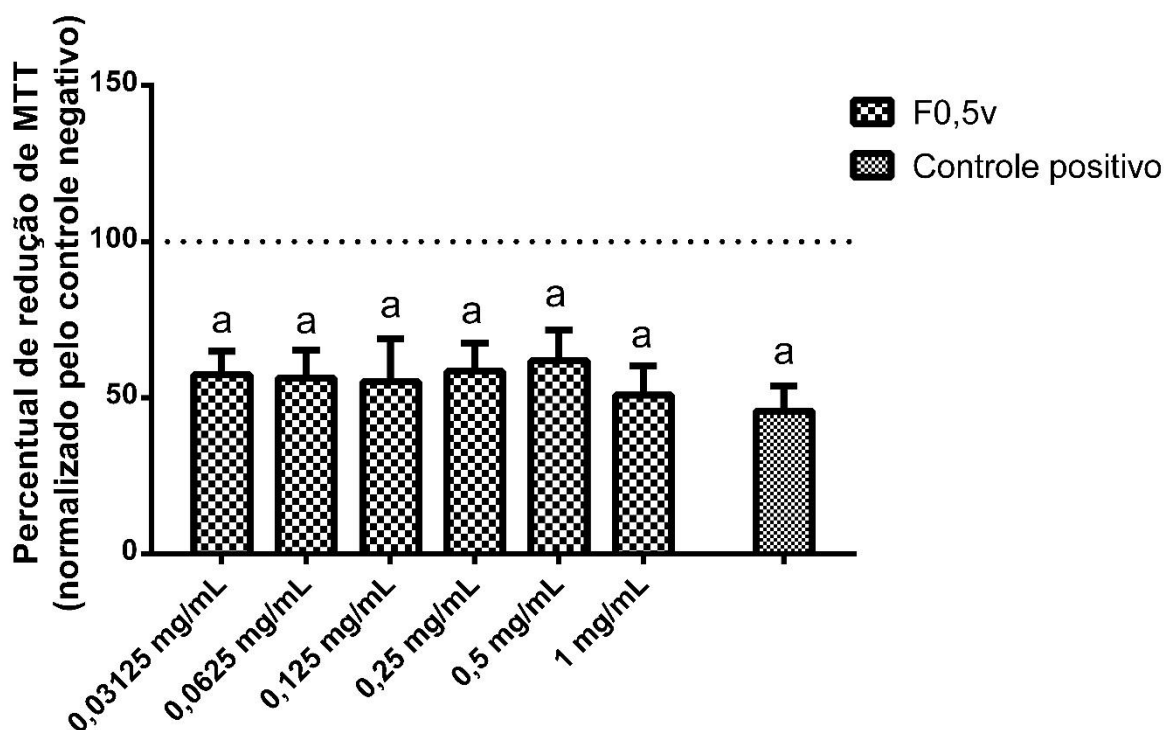


Figura 21. Percentual de redução do MTT das células MDCK após o tratamento profilático com diferentes concentrações de F0,5v e exposição ao H_2O_2 . Células não tratadas e expostas ao H_2O_2 foram utilizadas como controle positivo. O percentual de redução do MTT foi determinado considerando o controle negativo, células não tratadas por F0,5v e não expostas ao peróxido de hidrogênio, como "100%" de redução. Barras com a letra "a" acima não são estatisticamente diferentes do controle positivo e barras com a letra "b" acima são estatisticamente diferentes.

O tratamento profilático com F0,5v, em todas as concentrações testadas, não foi capaz de alterar significativamente ($p > 0,05$), em relação às não tratadas, o percentual de redução de MTT das células após a exposição ao H_2O_2 .

4.10.2. Efeito protetor

Para avaliar o efeito protetor da F0,5v, células MDCK foram expostas ao H_2O_2 concomitantemente a diferentes concentrações de F0,5v. Por fim avaliou-se capacidade de reduzir o MTT das células tratadas. Determinou-se o percentual de redução do MTT dos diferentes grupos tratados comparando a quantidade redução de MTT desses com a quantidade de redução do grupo controle negativo, ao qual se atribuiu o valor percentual de 100% (Figura 22).

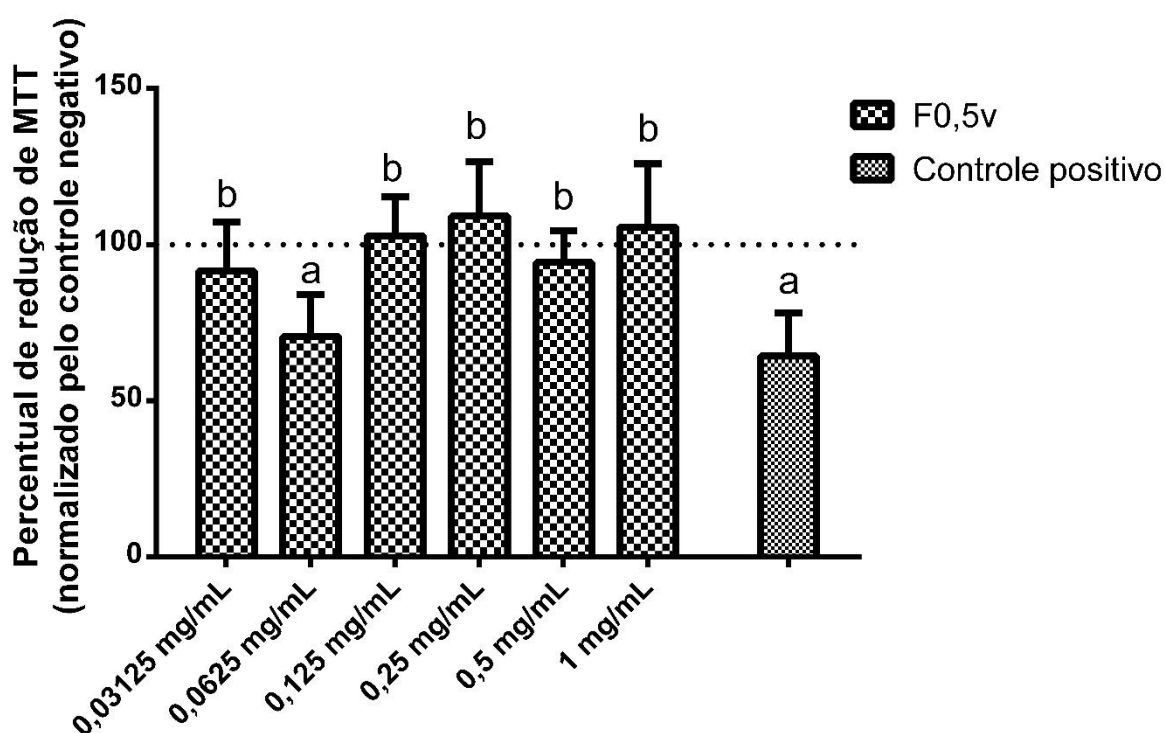


Figura 22. Percentual de redução do MTT das MDCK após o tratamento com diferentes concentrações de F0,5v concomitante com a exposição ao H_2O_2 . Células expostas ao H_2O_2 , na ausência de F0,5v, foram utilizadas como controle positivo. O percentual de redução do MTT foi determinado considerando o controle negativo, células não expostas ao H_2O_2 nem a F0,5v, como “100%” de redução. Barras com a letra “a” acima não são estatisticamente diferentes do controle positivo e barras com a letra “b” acima são estatisticamente diferentes.

O tratamento com peróxido de hidrogênio reduziu a capacidade das células MDCK em reduzir o MTT à 64%, controle positivo, do valor original, porém quando concomitante ao tratamento com peróxido houve adição da F0,5v, esse efeito foi nulo, percentual de redução do MTT igual ou maior que o do controle negativo, nos casos em que a F0,5v foi adicionada nas concentrações de 0,125; 0,25 e 1 mg/mL, ou quase nulo, percentual de redução do MTT quase igual ao do controle negativo, nos casos em que a F0,5v foi adicionada nas concentrações de 0,03215 mg/mL e 0,5 mg/mL.

De forma geral, a presença da F0,5v em quase todas as concentrações testadas, exceção da concentração de 0,0625 mg/mL, durante o estresse induzido pelo H₂O₂ aumentou significativamente ($p < 0,05$) a capacidade de redução do MTT das células em comparação àquelas que foram tratadas apenas com o H₂O₂, controle positivo.

Contudo, não houve correlação entre a concentração de F0,5v presente e o efeito protetor frente ao estresse do H₂O₂.

4.10.3. Efeito regenerativo

O efeito regenerativo da adição de F0,5v foi avaliado por meio de indução de dano por exposição ao H₂O₂ em células MDCK e tratamento posterior das células com diferentes concentrações de F0,5v por 24 h, por fim, a viabilidade celular após os diferentes tratamentos foi estimada a partir da capacidade da célula reduzir o MTT. O percentual de redução do MTT dos diferentes grupos tratados foi determinado a partir de comparações desses com o controle negativo, o qual foi considerado como 100% de redução do MTT (Figura 23).

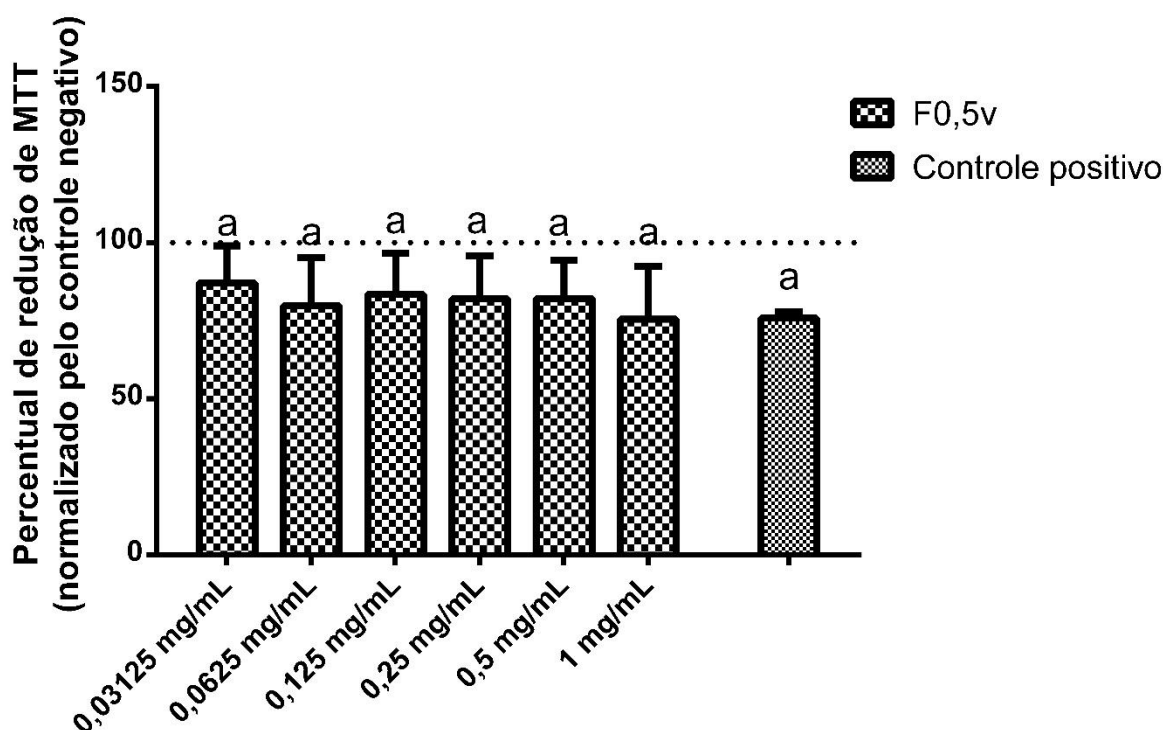


Figura 23. Percentual de redução do MTT das células MDCK expostas ao H₂O₂ e o tratamento regenerativo por adição de F0,5v em diferentes concentrações. Células expostas ao H₂O₂ e não tratadas com F0,5v foram utilizadas como controle positivo. O percentual de redução do MTT foi determinado considerando o controle negativo, células não expostas ao H₂O₂ nem a F0,5v, como “100%” de redução. Barras com a letra “a” acima não são estatisticamente diferentes do controle positivo e barras com a letra “b” acima são estatisticamente diferentes.

A exposição ao peróxido H₂O₂ diminuiu a capacidade das células MDCK em reduzir o MTT à 60% da capacidade normal, controle positivo. A presença da F0,5v, após o dano causado pelo H₂O₂ não alterou significativamente ($p > 0,05$) a capacidade das células em

reduzir o MTT, quando comparado com o controle positivo, em nenhuma das concentrações testadas.

4.11. Fracionamento da fração F0,5v por cromatografia de troca iônica

Visando a melhor compreensão do mecanismo de ação da F0,5v na modulação da morfologia dos cristais CaOx foram separados os diferentes polissacarídeos presentes na F0,5v e seus respectivos efeitos moduladores na cristalização do CaOx avaliados de forma individualizada, para isso a F0,5v foi fracionada por cromatografia de troca iônica, uma técnica adicional no processo de fracionamento.

Foram obtidas cinco diferentes subfrações a partir da F0,5v, as quais foram denominadas de acordo com a concentração de NaCl utilizada para a sua eluição: 0,2 M; 0,4 M; 0,5M; 0,6M; 1,0M. Foram recuperados 36% do total de massa de F0,5v aplicada à coluna de cromatografia de troca iônica após a centrifugação, as diferentes frações foram pesadas e a partir dos valores obtidos os rendimentos de cada fração foi determinado (Figura 24).

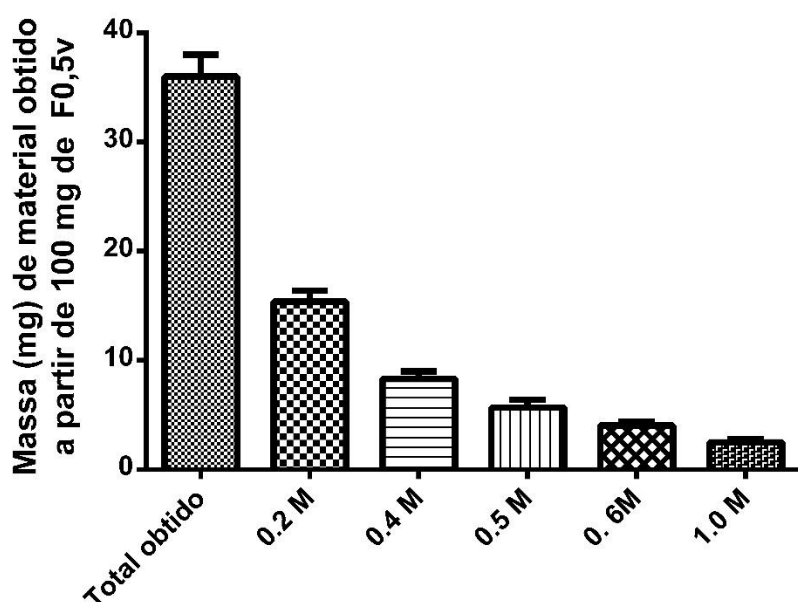


Figura 24. Representação gráfica dos valores de rendimento obtido nas diferentes subfrações de F0,5v após a cromatografia de troca iônica, bem como o rendimento total (total obtido). Os valores de rendimento foram calculados tomando como base a aplicação de 100 mg de F0,5v.

O rendimento obtido no processo de fracionamento por cromatografia de troca iônica referente a cada subfração foi calculado em relação à massa total de F0,5v aplicada na cromatografia. Os rendimentos obtidos nesse novo processo de fracionamento referente às subfrações 0.2 M e 0.4 M foram os maiores, 15,4 e 8,3 mg a cada 100 mg de F0,5v, respectivamente. Já os rendimentos obtidos referentes às subfrações 0.5 M e 0.6 M foram medianos, 5,7 e 4,1 mg a cada 100 mg de F0,5v, respectivamente, e, por fim, o rendimento referente à subfração 1.0 M foi o menor, apenas 2,5 mg a cada 100 mg de F0,5v.

4.12. Caracterização físico-química das subfrações de F0,5v

Assim como as frações cetônicas, as subfrações da F0,5v também foram caracterizadas físico-quimicamente pelos mesmos métodos. Além de também serem analisados quanto ao tamanho molecular por meio de cromatografia de exclusão de tamanho.

4.12.1. Caracterização química das subfrações de F0,5v

A quantidade de açúcares totais, proteínas, compostos fenólicos e sulfato e a composição monossacarídica das subfrações de F0,5v foram determinadas e a partir dessa quantificação calculamos o percentual de cada um desses componentes nas subfrações (Tabela 8).

Tabela 8 - Composição química das frações obtidas a partir da F0,5v pelo processo cromatografia de troca-iônica e precipitação por adição de metanol

Sbfracção	Açúcar total (%)	Fenólicos (%)	Proteínas (%)	Sulfato (%)
0.2 M	70,7 ± 0,9	<1	<1	8,4 ± 1,4
0.4 M	75,9 ± 5,0	<1	<1	17,7 ± 1,2
0.5 M	72,9 ± 4,9	<1	<1	18,6 ± 2,3
0.6 M	63,8 ± 3,0	<1	<1	19,4 ± 0,5
1.0 M	56,8 ± 3,4	<1	<1	16,9 ± 2,3

Não foi detectado presença de valores significativos de compostos fenólicos e proteínas em nenhuma das subfrações analisadas, o percentual de açúcar encontrado nas subfrações ficou na faixa de 56 a 75% de açúcar. Já em relação ao percentual de sulfato presente nas subfrações observou-se uma faixa de 16 a 19% de sulfato, com exceção da 0.2M, na qual foi encontrado apenas 8,4% de sulfato.

4.12.2. Determinação da composição monossacarídica das subfrações de F0,5v

A determinação da composição monossacarídica das subfrações foi realizado com auxílio de HPLC, assim como foram realizadas a caracterização das frações cetônicas, a partir da massa de cada monossacarídeo foi possível determinar a razão molar e o percentual de cada monossacarídeo nas subfrações (Tabela 9). Como a galactose é o monossacarídeo mais presente nas subfrações de F0,5v, ela foi como padrão para formar a curva de calibração a fim de que não houvesse discrepâncias na determinação da quantidade açúcar.

Tabela 9 - Razão molar e percentual entre os monossacarídeos presentes nas subfrações de F0,5v

Subfração	GluA*	Galactose	Glicose	Manose	Xilose	Fucose
0.2 M	37,1 (39%)	9,4 (10%)	40,0 (42%)	7,8 (8%)	0,4 (0,4%)	1,0 (1%)
0.4 M	6,1 (33%)	6,6 (36%)	0,6 (4%)	3,1 (17%)	0,9 (5%)	1,0 (5%)
0.5 M	2,2 (31%)	2,4 (34%)	0,6 (8%)	0,7 (9%)	0,2 (3%)	1,0 (14%)
0.6 M	3,1 (30%)	3,3 (32%)	1,6 (15%)	0,9 (9%)	0,3 (3%)	1,0 (10%)
1.0 M	9,4 (23%)	10,1 (24%)	16,1 (39%)	4,3 (10%)	0,4 (1%)	1,0 (2,4%)

* Ácido glucurônico.

A análise revelou que as subfrações são compostas majoritariamente por galactose e ácido glucurônico a soma desses dois monossacarídeos representou de 62 a 81% da composição das frações, as exceções à esta regra foram a 0.2 M e 1.0 M, que são majoritariamente formada por glicose, 42% e 39%, respectivamente. De forma geral todas as subfrações mostraram pouca quantidade de fucose e xilose e valores intermediários de manose.

4.12.3. Caracterização por eletroforese em gel de agarose das subfrações de F0,5v

As lâminas de gel de agarose contendo F0,5v e suas respectivas subfrações foram submetidas à corrida eletroforética, precipitação e coloração das bandas por azul de toluidina. Houve coloração de bandas em todas as linhas, com destaque para a linha referente à subfração 0.2 M, cuja coloração foi bastante reduzida (Figura 25). As bandas referentes às amostras foram analisadas quanto ao padrão de migração e a metacromasia.

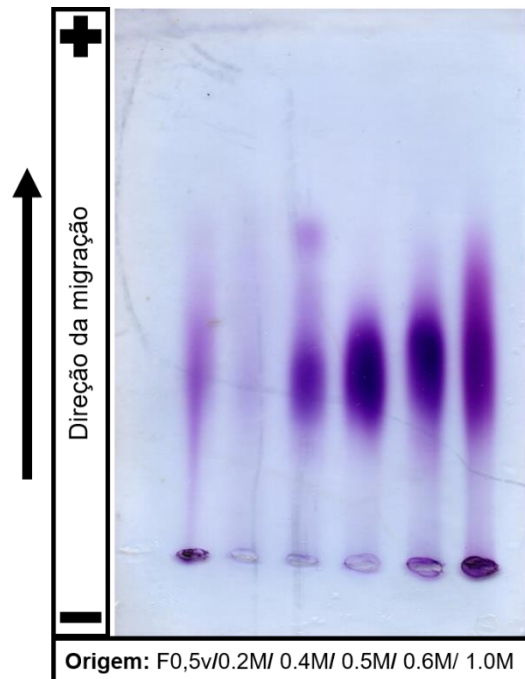


Figura 25. Imagem da lâmina eletroforese contendo as subfrações obtidas pela cromatografia de troca iônica. A metacromasia observada é resultado da coloração por azul de toluidina.

Cada uma das diferentes amostras submetidas a eletroforese em gel de agarose formaram apenas uma banda e de mesmo padrão de migração, porém com intensidades de metacromasia diferentes entre si. As exceções dessa regra foram as subfrações 0.2 M, que não formou banda alguma e 0.4M, que formou duas bandas, sendo a primeira semelhante às bandas das outras amostras e a segunda bem pequena e de alta distância de migração, para qual não foi observado nenhuma semelhança entre ela e qualquer outra banda.

Quanto à metacromasia, as bandas das subfrações tiveram todas, com exceção da 0.2 M, maior metacromasia que a banda da F0,5v. Dentre as subfrações, as bandas com maior intensidade de cor foram, na ordem, 0.5 M e 0.6 M. 1.0 M, 0.4 M e 0.2 M.

4.12.4. Análise das subfrações de F0,5v por cromatografia líquida de exclusão por tamanho

A F0,5v e suas respectivas subfrações foram submetidas à cromatografia líquida de exclusão por tamanho (CLET) e detectadas por meio do índice de refração. Os dados obtidos foram utilizados para elaborar o cromatograma apresentado abaixo (Figura 26).

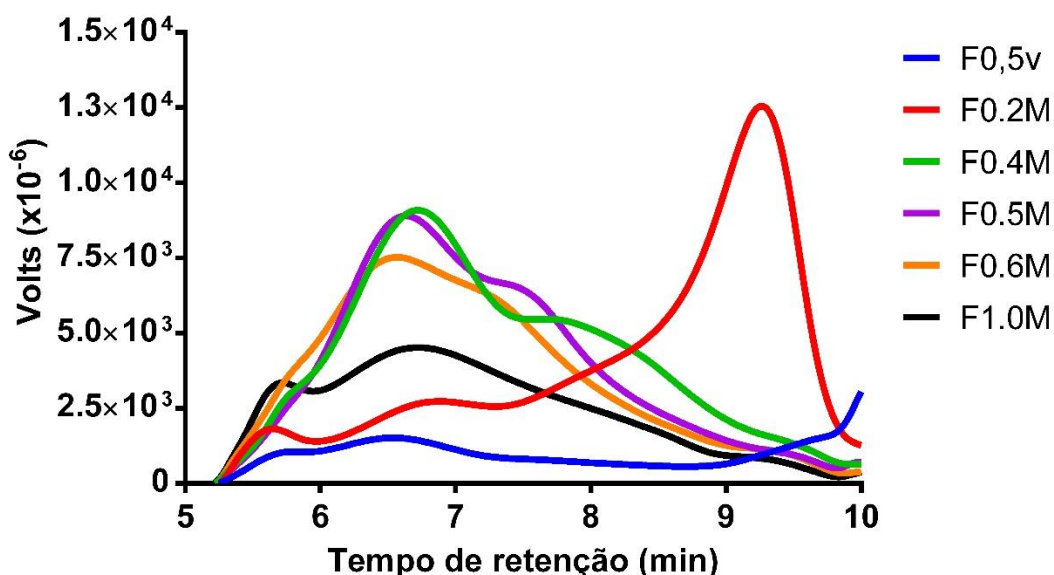


Figura 26. Cromatograma obtido a partir da análise da F0,5v e suas subfrações por meio CLAE acoplada à um detector de índice de refração. Os valores presentes no eixo Y referem-se à capacidade do eluído em refratar a luz, podendo essa ser associada com a natureza do material ou sua concentração.

O cromatograma correlaciona as alterações no índice de refração do eluato, que é dada em Volts e corresponde à presença de material, e o tempo que o material a ser eluído ficou retido na coluna, denominado de tempo de retenção aproximado.

O cromatograma da fração cetônica F0,5v demonstra que há duas populações distintas nessa fração cetônica, a primeira teve um tempo de retenção aproximado de 5,8 minutos e a segunda um tempo de retenção aproximado de 6,5 minutos. Há um indicativo de uma outra população com tempo de retenção aproximado de 9,3 minutos, porém como não formou um pico bem definido no cromatograma acima foi desconsiderado. A subfração F0,2M é constituída por três populações, as quais tiveram os respectivos tempos de retenção aproximados: 5,6; 6,9 e 9,7 minutos. As subfrações 0,4 M, 0,5 M e 0,6 M são constituídas principalmente por uma população que teve tempo de retenção aproximado entre 6,6 e 6,7 minutos e a subfração 1,0 M é formada por duas populações, as quais tiveram o tempo de retenção aproximado de 5,7 e 6,7 minutos, respectivamente.

A partir da comparação entre o tempo de retenção aproximado dos componentes que compõe a F0,5v e suas subfrações e o tempo de retenção aproximado dos padrões de dextranas foi possível estimar o tamanho molecular dos componentes (Tabela 10).

Tabela 10 - Principais picos observados nos cromatogramas da F0,5v e suas subfrações e a estimativa de tamanho molecular referente a cada pico

Amostra	Tempo de retenção aproximado (min)	Tamanho estimado (kDa)
F0,5v	~5,8	232
	~6,5	174
0.2 M	~5,6	245
	~6,9	150
	~9,3	7
0.4 M	~6,7	162
0.5 M	~6,6	168
0.6 M	~6,6	172
1.0 M	~5,7	241
	~6,7	161

As populações presentes na F0,5v têm tamanho molecular de 232 e 174 kDa, já as populações que constituem a 0.2 M têm tamanho de 245, 150 e 7 kDa; a 0.4 M, 0.5 M e 0.6 M são constituídas por uma população de tamanho molecular entre 162 e 172 kDa e 1.0 M é constituída por uma população com tamanho de 241 kDa e outra com 161 kDa.

4.13. Avaliação do potencial antioxidante da F0,5v e das suas subfrações

O potencial antioxidante da F0,5v e suas subfrações foi determinado por meio dos seguintes métodos: capacidade antioxidante total, sequestro de radicais hidroxila, sequestro de radicais superóxido, sequestro de óxido nítrico e mitigação do dano celular provocado por peróxido de hidrogênio

4.13.1. Capacidade antioxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante total da F0,5v e suas subfrações foi determinado por meio do potencial em reduzir o molibdato em meio ácido (Figura 27). Para critérios de comparações utilizou-se o ácido ascórbico como padrão de referência.

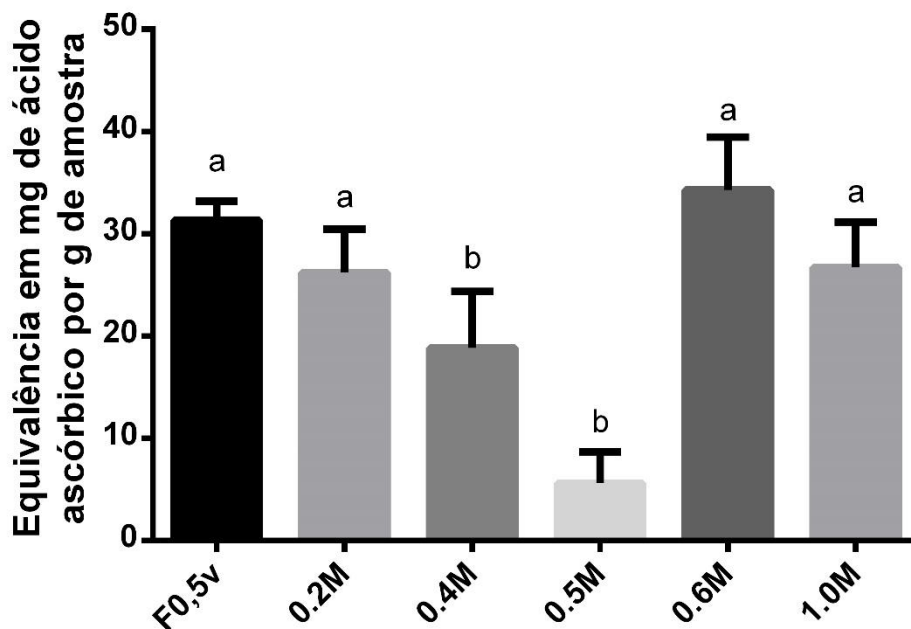


Figura 27. Avaliação da capacidade antioxidante total da fração F0,5v e suas subfrações por meio da redução do molibdato. A capacidade antioxidante das amostras está expressa pelo equivalente de ácido ascórbico necessário para produzir o efeito gerado por um grama de amostra. A concentração das amostras durante o ensaio foi de 0,1 mg/mL. Barras com a letra “a” acima não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) do resultado da F0,5v e com a letra “b” acima são estatisticamente diferentes.

A presença tanto da F0,5v como de qualquer subfração foi capaz promover ação antioxidante e reduzir o molibdato. A atividade antioxidante média encontradas em um grama da F0,5v foi equivalente a 31 mg de ácido ascórbico e não houve diferença estatística entre ela e as atividade antioxidantes das subfrações 0.2 M, 0.6 M e 1.0 M, que variaram de 26 a 35 mg de equivalência em ácido ascórbico. A atividade antioxidante da subfração 0.4 M, 0.5 M foram equivalentes a 18 e 6 mg de ácido ascórbico, respectivamente, o que representa uma atividade antioxidante inferior à das outras subfrações e estatisticamente menor que a atividade da F0,5v.

4.13.2. Sequestro de radicais hidroxila

O efeito da presença da F0,5v e suas subfrações no ambiente gerador de OH° foi determinado a partir da produção *in vitro* da reação de Fenton. O efeito de cada uma das amostras testadas foi comparado com o grupo controle, ausência de qualquer aditivo, para determinar o percentual de sequestro de radicais hidroxila (Figura 28).

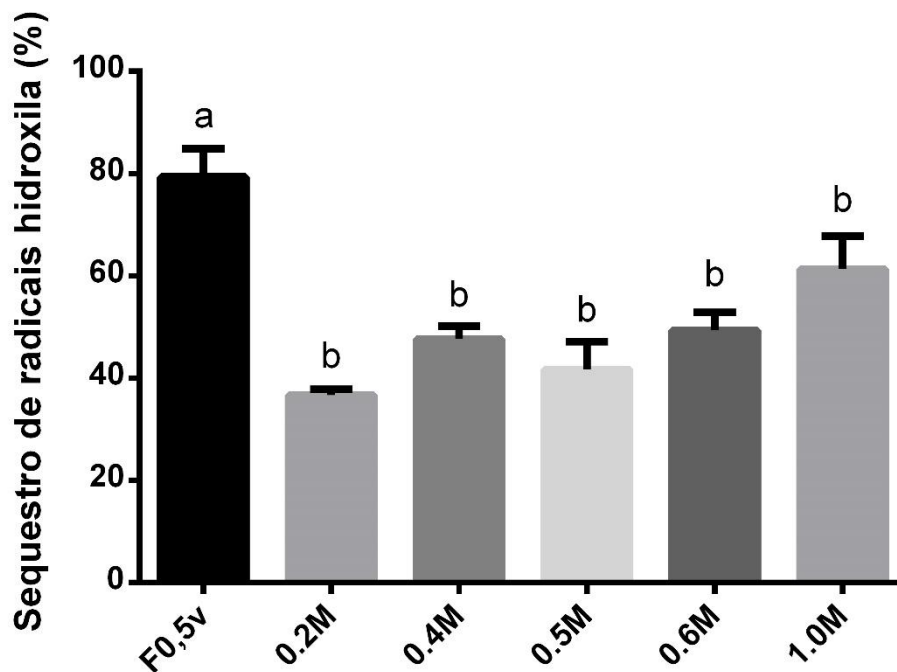


Figura 28. Percentual de sequestro dos radicais $\cdot\text{OH}$ pela presença da fração F0,5v e suas respectivas subfrações durante a produção *in vitro* da reação de Fenton. O percentual de sequestro dos $\cdot\text{OH}$ foi determinado considerando como “0%” de sequestro o ensaio realizado na ausência de qualquer antioxidante. A concentração das amostras durante o ensaio foi de 2,0 mg/mL. Barras com a letra “a” acima não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) do resultado da F0,5v e com a letra “b” acima são estatisticamente diferentes.

Todas as amostras testadas foram capazes de sequestrar OH° geradas no modelo *in vitro* da reação de Fenton. A presença da F0,5v resultou no sequestro de 79% dos OH° , sendo a amostra mais potente das testadas, já o percentual de sequestro de OH° das subfrações variou entre 37 e 61%, sendo a 0.2M referente aos 37% de sequestro e a 1.0M aos 61%, a capacidade de sequestrar OH° de todas as subfrações foi estatisticamente menor que a da F0,5v.

4.13.3. Sequestro de radicais superóxido

O efeito da presença da F0,5v e suas respectivas subfrações durante uma reação geradora de radicais O_2^- foi avaliado. A partir da comparação entre as quantidades de radicais nos ensaios realizados na presença das amostras com o realizado na ausência de qualquer aditivo, grupo controle, foi possível determinar o percentual de sequestro de radicais O_2^- promovido por cada uma das amostras (Figura 29).

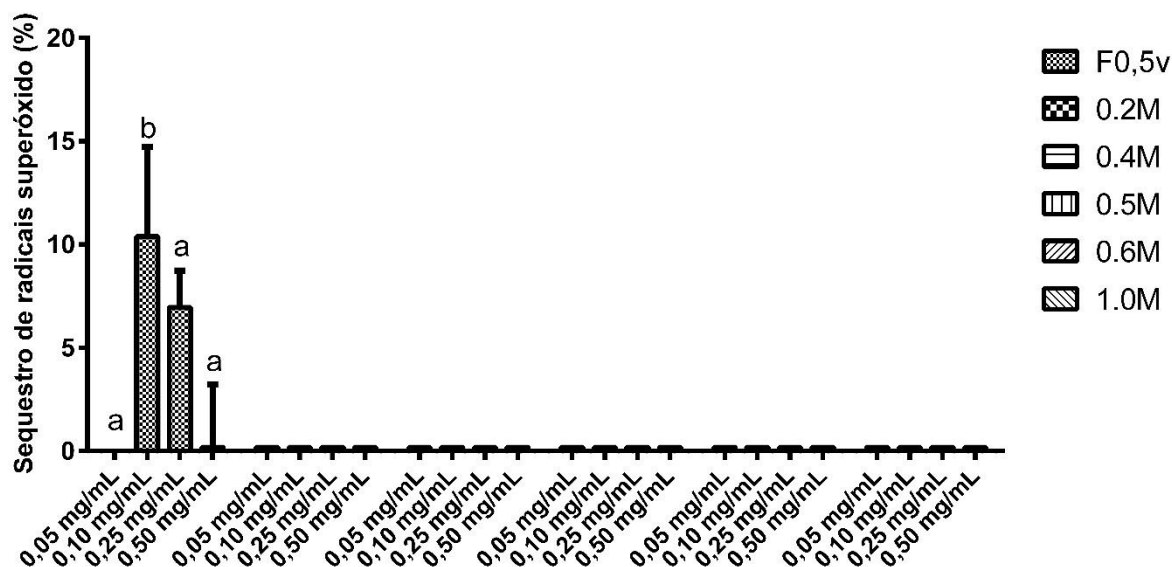


Figura 29. Percentual de radicais O_2^- sequestrados devido à adição de F0,5v e suas subfrações. O percentual de sequestro de O_2^- foi determinado considerando como "0%" de sequestro o ensaio realizado na ausência de qualquer antioxidante. Barras com mesma letra acima não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) entre si e as barras com a letras diferentes acima são estatisticamente diferentes.

Em nenhuma das condições testadas a presença das subfrações foi capaz de sequestrar qualquer percentual de radicais O_2^- , enquanto a fração F0,5v foi capaz de sequestrar radicais O_2^- nos percentuais de 8 e 10% quando adicionada nas concentrações de 0,25 mg/mL e 0,10 mg/mL, respectivamente.

4.13.4. Sequestro de óxido nítrico

A capacidade de sequestro de radicais $\bullet NO$ da F0,5v e suas subfrações foi avaliada a partir da adição dessas em ambiente gerador de radicais $\bullet NO$. Comparando a quantidade de radicais $\bullet NO$ medida no grupo controle com a quantidade de radicais medida nos ensaios em que houve a adição das amostras foi possível calcular o percentual de sequestro de radicais $\bullet NO$ promovido por cada uma das amostras testadas (Figura 30).

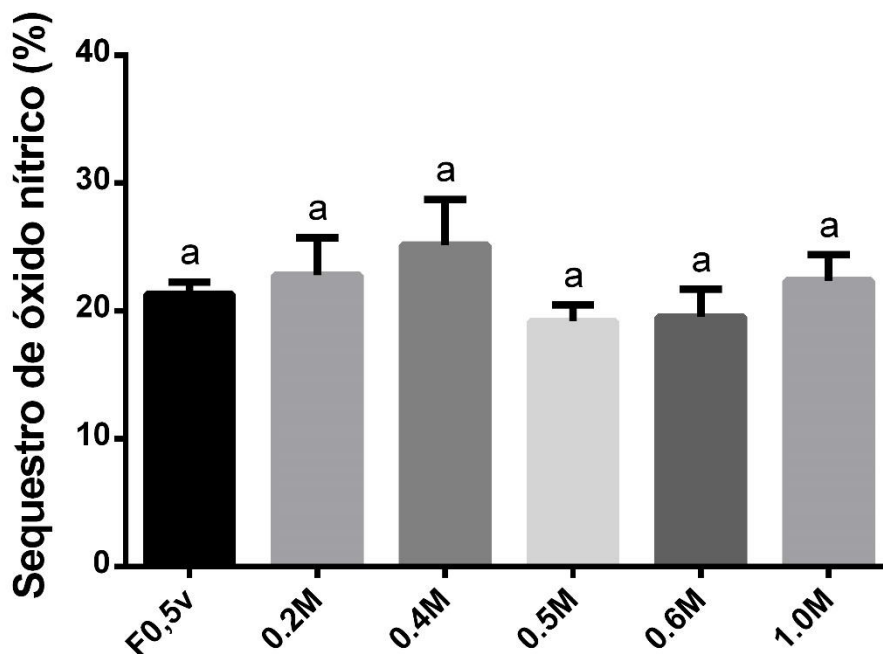


Figura 30. Percentual de radicais \bullet NO sequestrados devido a presença da fração F0,5v e suas subfrações. O percentual de sequestro de \bullet NO foi determinado considerando como “0%” de sequestro o ensaio realizado na ausência de qualquer antioxidante. A concentração das amostras durante o ensaio foi de 5,0 mg/mL. Barras com a letra “a” acima não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) do resultado da F0,5v e com a letra “b” acima são estatisticamente diferentes.

Todas as amostras testadas foram capazes de sequestrar \bullet NO. Os percentuais \bullet NO sequestrados pela presença das diferentes amostras tiveram pouca diferença entre si, eles variaram de 19%, quando houve a adição da 0.5 M, até 25%, quando houve a adição. Não houve diferença estatística entre o percentual de \bullet NO sequestrado pela F0,5v e nenhuma das subfrações.

4.14. Análises do efeito modulador de cristalização da F0,5v e suas subfrações por microscopia óptica

Avaliou-se a capacidade de modular a cristalização do CaOx de cada uma das subfrações da F0,5v, bem como da fração não fracionada, todas na concentração de 0,1 mg/mL. As etapas de indução da cristalização, obtenção das imagens e contagem dos cristais foram as mesmas adotadas na avaliação do efeito modulador das frações cetônica. Uma representação das alterações morfológicas promovidas pela presença da F0,5v ou das suas subfrações pode ser observada na figura a seguir (Figura 31).

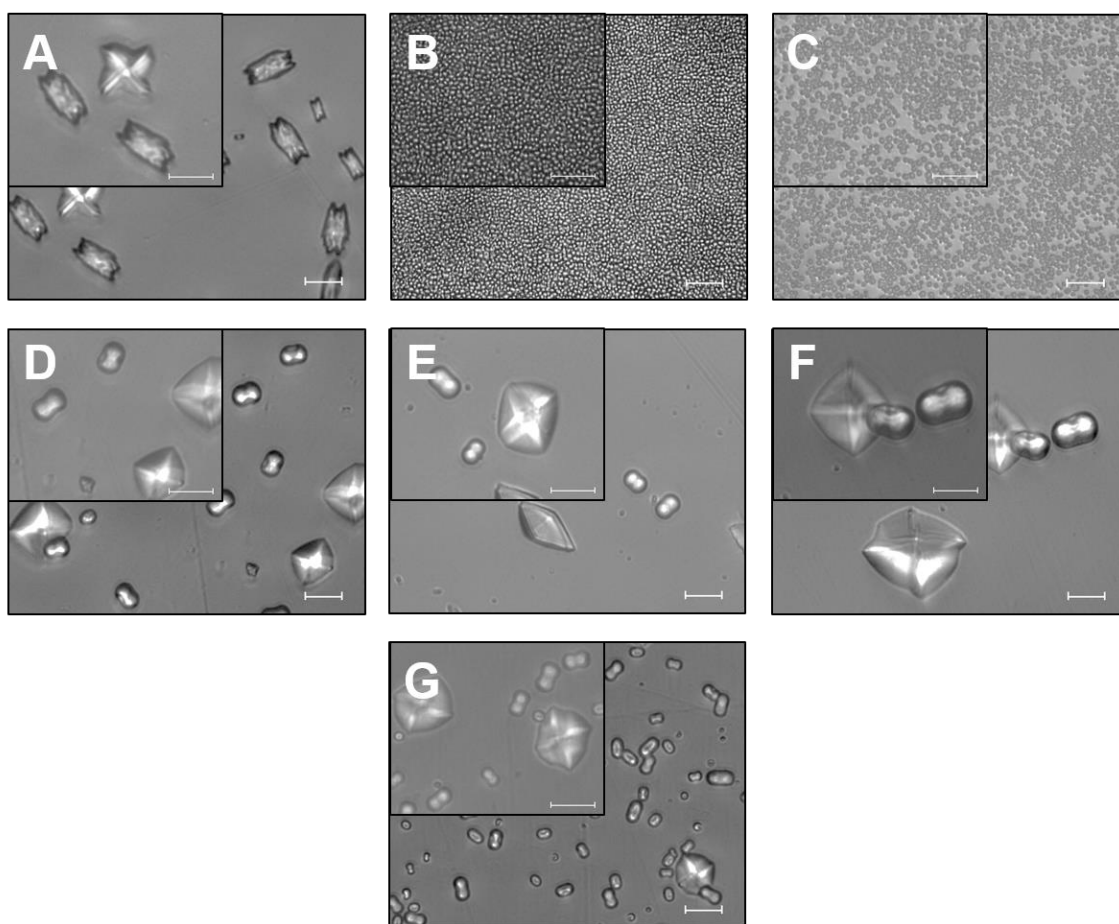


Figura 31. Cristais de CaOx observados por microscopia óptica nos aumentos de 200x (imagem maior) e 400x (imagem menor). Os cristais foram formados na ausência (A) ou presença de 0,1 mg/mL de F0,5v (B), 0.2 M (C) F0.4 M (D), 0.5 M (E), 0.6 M (F) ou 1.0 M (G). A escala (barra branca no canto inferior direito) representa, em todas as imagens, o comprimento de 20 μm .

Os dados referentes ao número, tamanho e morfologia dos cristais formados na presença da F0,5v e suas subfrações estão sumarizados na tabela abaixo (Tabela 11)

Tabela 11 - Dados referentes à contagem e a diferenciação dos cristais formados na ausência ou presença da F0,5v ou uma das suas subfrações

Fração	N° de cristais por imagem (normalizado pelo controle)	Percentual de CODs*	Tamanho dos CODs (μm)	Comprimento dos COMs (μm)
Controle	$1 \pm 0,2^a$	8,0%	$20,20 \pm 2,54^a$	$21,13 \pm 6,22^a$
F0,5v	$801 \pm 45,5^b$	100%	$1,65 \pm 0,29^b$	N/A [†]
0.2 M	$377 \pm 17,2^c$	100%	$4,51 \pm 1,11^c$	N/A [†]
0.4 M	$0,4 \pm 0,2^a$	54%	$32,22 \pm 4,91^d$	$10 \pm 3,53^b$
0.5 M	$0,7 \pm 0,2^a$	35%	$27,37 \pm 6,75^e$	$14,61 \pm 1,87^c$
0.6 M	$5,6 \pm 1,1^a$	6,2%	$20,41 \pm 3,57^a$	$7,91 \pm 2,75^d$
1.0 M	$0,35 \pm 0,1^a$	10%	$37,16 \pm 6,51^f$	$18,27 \pm 4^e$

Os números apresentados são referentes a contagens feitas a partir de imagens obtidas por microscopia óptica. Devido à ausência de cristais do tipo COM não foi possível realizar as medições de comprimento em alguns grupos e por isso estão marcados com N/A. Grupos que apresentam a mesma letra ^{abcdef} são estatisticamente iguais.

Foram contados em média $227,11 \pm 50,2$ cristais por imagem do grupo controle, dos quais 8% eram COD, o comprimento médio dos COM formados no grupo controle foi de $21,13 \pm 6,22 \mu\text{m}$ e o tamanho médio dos COD foi de $21,13 \pm 6,22 \mu\text{m}$.

Quanto ao número de cristais, a presença das subfrações 0.4 M, 0.5 M e 1.0 M reduziu o número de cristais formados para 0,4, 0,7 e 0,35 vezes o número de cristais formados em relação ao grupo controle, respectivamente, já a presença das subfrações 0.6 M e 0.2 M e a fração F0,5v aumentou o número de cristais formados para 5,6, 377 e 801 vezes, respectivamente, o número de cristais formados em relação ao grupo controle, sendo estatisticamente significativo o aumento promovido apenas pela 0.2 M e F0,5v.

A adição da F0,5v ou das suas subfrações reduziu o tamanho dos COD e o comprimento dos COM, com exceção das subfrações 0.4 M, 0.5 M e 1.0M, cuja presença na cristalização resultou em COD de tamanho maior que os do grupo controle, embora o comprimento dos COM formados na presença das mesmas fração tenha sido menor que os do grupo controle.

A média de tamanho dos COD formados na presença das amostras variou entre $37,16 \mu\text{m}$ e $1,65 \mu\text{m}$, sendo o maior tamanho observado nos cristais formados na presença da 1.0 M e o menor na presença da F0,5v. Já o comprimento dos COM variou de $18,27 \mu\text{m}$ a $7,91 \mu\text{m}$, sendo o maior tamanho observado nos cristais formados na presença da 1.0 M e o menor na presença da 0.4 M.

Quando na presença da F0,5v ou das suas subfrações foram formados mais COD que no grupo controle, com exceção da subfração 0.6 M, cuja presença reduziu o percentual de COD de 8% do grupo controle para 6,2%. A adição das subfrações 1.0 M, 0.5 M, 0.4 M, 0.2 M e da F0,5v aumento o percentual de COD entre os cristais formados de 8% do grupo controle para 10%, 35%, 54%, 100% e 100%, respectivamente.

5. Discussão

A alga em estudo, *Dictyopteris delicatula*, já foi avaliada anteriormente pelo grupo de pesquisa em que se insere essa dissertação (Magalhaes *et al.*, 2011). Utilizando a precipitação acetona, Magalhães e colaboradores (2011) obtiveram 6 frações ricas em polissacarídeos sulfatados (F0,5v; F0,7v; F1,0v; F1,3v; F1,5v; F2,0v) que apresentaram atividades antioxidante, anticoagulante e/ou antiproliferativa com diferentes intensidades. E baseado na composição monossacarídica, os autores assumiram que cada uma dessas frações continham uma população distinta de PS, por isso assumiram que essa alga sintetizava 6 populações distintas de PS (Magalhaes *et al.*, 2011).

Aqui, neste trabalho, ao se utilizar o mesmo protocolo de extração e fracionamento de PS da alga *D. delicatula*, se obteve apenas 5 frações ricas em polissacarídeos. A fração F1,3v, vista por Magalhães e col. não foi obtida. Ainda seguindo esta linha de comparação,

se observa que os valores sobre teor de polissacarídeos, sulfato, e composição monossacarídica são semelhantes entre si na maioria dos casos, mas algumas diferenças marcantes são visíveis, como o teor de sulfato de F2,0v, que Magalhães e col. apresentaram para essa fração valores de 16%, enquanto aqui, se obteve valores em torno de 7%. Diferenças como essa também são apontadas por outros autores (Honya *et al.*, 1999; Men'shova *et al.*, 2012; Rioux, Turgeon e Beaulieu, 2009; Siddhanta *et al.*, 2001) e são justificadas pela resposta das algas as variações abióticas e bióticas que ocorrem nos ambientes em que as algas vivem.

Como exemplo, estudos o PS obtidos da alga *Costaria costata* em diferentes períodos do ano (Costa, 2016; Skriptsova *et al.*, 2010). Estes autores coletaram a alga *C. costata* e extraíram PS na primavera (abril, maio) e verão (junho e julho) e verificaram que havia mudanças no rendimento, composição química, massa molecular e conteúdo de sulfato dependendo da estação do ano. Na primavera foram extraídas heterofucanas pouco sulfatadas, constituídas por fucose, galactose, manose e ramnose, além de traços de xilose e glicose (Fuc:Gal:Man:Rha razão 1:0,27:0,38:0,19). Já no verão houve uma diminuição significativa na quantidade dos monossacarídeos manose e ramnose e não se observou traços de xilose e glicose (Fuc:Gal:Man:Rha razão 1:0,29:0,08:0,06), enquanto o teor de sulfato aumento em comparação à extração anterior (Imbs *et al.*, 2009). Portanto, acredita-se que a diferença nos números de frações cetônicas aqui obtidas e aquele publicado por Magalhães e colaboradores (2013) tenha ocorrido por causa desse motivo.

Outro fato importante sobre o trabalho de Magalhães e colaboradores (2013) é que esses autores assumiram que essa alga sintetizava 6 populações distintas de PS, ao avaliarem as frações em sistema de eletroforese proposto por Dietrich e Dietrich (1976). Esta técnica, apesar de ser tida como “low-tech” é muito eficaz para se visualizar a presença de diferentes populações de polissacarídeos ácidos em soluções. Para análise de PS de algas, o seu uso foi proposto em 1995, quando se mostrou que PS das algas *Dictyota mertensis*, *Padina gymnospora* e *Sargassum vulgare* tinham em suas constituição três bandas com mobilidades eletroforéticas diferentes, e que de acordo com essa mobilidade, foram denominadas de bandas A, B e C, sendo a banda A de menor migração, a banda B de migração intermediária e a banda C de maior migração (Dietrich *et al.*, 1995).

Posteriormente, verificou-se que outra alga marrom, a *Spatoglossum schröderi*, também apresentava três bandas em eletroforese (Leite *et al.*, 1998), e, em trabalhos posteriores, comprovou-se que cada uma dessas bandas era uma fucana diferente (que hoje, por serem heterofucanas, seriam denominadas de fucoidans), que foram denominadas de fucanas A, B e C (Rocha *et al.*, 2005). Portanto, quando visualiza-se a lâmina de eletroforese (Figura 14) e verifica-se a presença de três bandas com mobilidades diferentes, pode-se dizer que Magalhães e colaboradores (2013) foram precipitados em afirmar que *D. delicatula*

sintetiza seis populações distintas de PS. E propõem-se aqui que *D. delicatula* sintetiza na verdade três populações distintas de PS.

Em relação à composição monossacarídica (Tabela 4) das frações verifica-se a presença de fucose em todas elas. O que leva a propor que essas três populações são provavelmente heterofucanas. Essa nova interpretação para os PS de *D. delicatula* está em maior consenso com estudos publicados anteriormente (Rocha *et al.*, 2005; Camara *et al.*, 2011). Pois, quando se observa os estudos mais recentes com PS das Dictyotales, classe de algas onde se insere a *Dictyopteris delicatula*, a ocorrência de três heterofucanas (Rocha *et al.*, 2005), até mesmo 4 (Camara *et al.*, 2011) em uma mesma alga já foi demonstrada, mas relatos com números maiores que esses não foram observados.

Analisando-se o padrão de bandas formados após a coloração com azul de toluidina sugere-se que *D. delicatula* sintetiza, assim como a alga *S.schröderi*, três heterofucanas, que a partir desse momento passaram a ser denominadas de heterofucana A, B e C.

A heterofucana A está presente em maior quantidade nas frações cetônicas F0,5v e F0,7v. Já a heterofucana B está bem mais evidente na fração F1,0v. Enquanto, que a heterofucana C está visivelmente em maior quantidade nas frações F1,5v e F2,0v. Contudo, vale lembrar que a não visualização da heterofucana em uma fração, não descarta a possibilidade de ela estar presente nessa fração. Ele poderia estar em baixa concentração e, portanto, não se corar com o azul de toluidina.

No caso das Dictyotales, as suas heterofucanas A são mais ricas em ácido glucurônico e menos sulfatadas, enquanto as heterofucanas C são mais ricas em monossacarídeos neutros, principalmente galactose, já as heterofucanas B são compostos intermediários (Albuquerque *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005). Essas composições assemelham-se com aquela aqui observada (Tabela 4), como também corrobora com aquela descrita para frações cetônicas obtidas de Dictyotales. Usualmente, as frações cetônicas obtidas no início do fracionamento costumam ser ricas em ácido glucurônico e menos sulfatadas. Contudo, os teores vão mudando concomitantemente com o volume acetona usado, a ponto daquelas frações obtidas no final do processo serem mais sulfatadas e ricas em galactose (Camara *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2013; Paiva, 2016). Todavia, quando se observa a quantidade de ácido urônico em F0,5v e F0,7v, verifica-se que essa premissa não foi seguida, já que elas são mais ricas nesse monossacarídeo. Esse é um indicativo de que essas frações tenham também em sua composição alginato (ácido algínico). Os ácidos algínicos são polissacarídeos constituídos apenas de monossacarídeos carboxilados, são muito comuns em algas marrons e já foram descritos em outras Dictyotales (Dietrich *et al.*, 1995; Patil *et al.*, 2018; Zhang, Show e Ho, 2019). A presença da glicose também chamou a atenção. É possível que exista em algumas das frações a presença de laminarina, uma glucana comum em algas marrons (Zargarzadeh *et al.*, 2020). Além disso, a presença de glucanas sulfatadas já foi descrita em

Dictyopteris justii (Melo et al., 2014), o que poderia levar a sugestão de que há glucanas nessas frações. Todavia, não se pode descartar a possibilidade de a glucose estar ligada covalentemente as fucanas/fucoidans dessa alga. Futuros trabalhos de purificação e caracterização estrutural dos PS de *D.delicatula* poderão confirmar ou refutar estas observações aqui apresentadas.

Quando essas frações foram avaliadas como moduladores da formação de cristais de CaOx verificou-se que elas foram capazes de interferir nesse processo. Observou-se aumento no número e redução de tamanho dos cristais que se formaram na presença das frações cetônicas. Acredita-se que isso ocorreu porque durante a cristalização do CaOx, os íons de cálcio e oxalato disponíveis em solução são direcionados ou para a nucleação ou crescimento dos cristais e na presença das frações houve, possivelmente, um favorecimento no consumo dos íons para o processo de nucleação, o que reduziu a disponibilidade de íons para o crescimento dos cristais CaOx. Esse mecanismo de ação já foi proposto anteriormente por Atmani e Khan em 2010 ao avaliar a atividade antiurólítica do extrato de *Herniaria hirsuta*, uma planta pertencente à família Caryophyllaceae, e identificar que a presença do extrato na cristalização do CaOx aumentou o número de cristais formados, reduziu o tamanho deles, não alterou a morfologia bipiramidal dos COD e inibiu totalmente a formação de COM (Atmani e Khan, 2000), todas as características dos cristais que foram formados na presença da F0,5v.

A prevalência da formação de COM sobre os COD quando a cristalização ocorre na ausência de aditivos ocorre devido a maior estabilidade termodinâmica dos COM (Šter et al., 2018), porém a presença da F0,5v parece não apenas induzir a formação de COD, mas também desestabilizar a formação de COM, de forma que ao final da cristalização apenas COD são formados (Tabela 5).

Cristais CaOx formados numa concentração de cálcio mais elevada que a concentração de oxalato tendem a ser do tipo COD (Daudon et al., 2016), portanto a promoção de cristais COD é, provavelmente, devido à característica iônica dos polissacarídeos sulfatados, que permite a eles atraírem íons cálcio e formarem microambientes em que a concentração de cálcio é mais elevada que no resto da solução, um mecanismo que já foi proposto em estudos utilizando polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Laminaria japonica* (Ouyang et al., 2010) e polissacarídeos carboxilados de plantas (Huang et al., 2017). Já a inibição da formação de COM por polissacarídeos sulfatados ocorre devido à inibição rápida e total do crescimento dos cristais, os quais permanecem muito pequenos e são dissolvidos (Huang et al., 2017).

Embora a ação moduladora tenha sido observada durante a adição de todas as frações a intensidade do efeito é variada entre elas. Com a presença de F0,5v teve-se o maior efeito modulador, que foi seguido pelo efeito de F0,7v; F1,5; F1,0v e F2,0v em decrescente

de intensidade de efeito. Não se identificou uma correlação desse efeito com composição química das frações, nem mesmo com relação ao teor de sulfato. Apesar de alguns autores demonstrarem relação positiva entre número de cargas negativas e a atividade de modulação dos cristais, como Akin e colaboradores (2008) ao avaliar o potencial antiurolítico de inulina com diferentes graus de carboxilação ou Huang e colaboradores (2017) ao avaliar a capacidade de modular a cristalização do CaOx de polissacarídeos de plantas com diferentes quantidades de carboxilas.

O potencial zeta dos cristais formados na presença de frações cetônicas foi altamente negativo (Tabela 6), acredita-se que esse resultado é reflexo da interação direta entre as frações cetônicas os cristais CaOx (Gomes *et al.*, 2019; Robertson, 2017), portanto a modulação na morfologia dos cristais induzida pelas frações cetônicas parece ter sido causada por meio uma interação química direta e não por alterações nas supersaturação ou outros parâmetros que influenciam a cristalização. O aumento da carga negativa do potencial zeta de cristais CaOx como indicativo da ligação direta entre o polissacarídeo sulfatado e os cristais já foi descrito em trabalhos anteriores (Bhadja, Lunagariya e Ouyang, 2016; Gomes *et al.*, 2019).

A capacidade de modulação da cristalização do CaOx da F0,5v foi muito intensa, maior do que qualquer outra fração. Melo e colaboradores (2013) ao utilizar polissacarídeos sulfatados da alga marrom *D. justii* como moduladores da cristalização do CaOx também observaram redução no tamanho dos cristais, aumento no número de cristais e a inibição total da formação de COMs, assim como Gomes e colaboradores (2019) ao utilizar galactanas sulfatadas da alga verde *Caulerpa cupressoides*, porém em nenhum dos casos supracitados observou-se uma ação tão intensa como a descrita neste trabalho para a F0,5v, que chegou a aumentar em mais de mil vezes o número de cristais.

Resultados mais próximos ao descrito neste trabalho foram obtidos por Atmani e Khan em (2000) utilizando extratos da planta *Herniaria hirsuta*. A relação entre F0,5v e o extrato de *Herniaria hirsuta* é interessante, pois trabalhos posteriores do mesmo autor demonstraram ação antiurolítica da *Herniaria hirsuta* em animais (Atmani *et al.*, 2003; Atmani Fouada, 2006), o que pode ser considerado um indicativo que a F0,5v possa desempenhar também ação antiurolítica *in vivo* e motiva a continuação dos estudos com essa fração.

Assim, inicialmente repetiu-se os experimentos de avaliação do efeito modulador da cristalização utilizando diferentes concentrações da F0,5v e realizou-se a contagem e a medição dos cristais, e independente da concentração utilizada, os cristais formados na presença de F0,5v sempre foram do tipo COD, como foi observado nas análises de infravermelho, que é uma das técnicas utilizadas para tal (Sun *et al.*, 2015). Esta confirmação foi importante, porque, embora haja uma relação entre a morfologia do cristal CaOx e o grau de hidratação (se é COM, COD ou COT), a confirmação do tipo de cristal apenas por

microscopia de campo claro não é totalmente confiável, pois na presença de aditivos, como os polissacarídeos, pode se observar modificações na morfologia sem obrigatoriamente ocorrer mudanças no grau de hidratação.

Verificou-se também que o efeito modulador de F0,5v foi proporcional a sua concentração, inclusive observa-se nos resultados que há uma relação inversa entre o número de cristais formados e o tamanho deles. Porém, há um fato a ser destacado, o da relação entre a concentração de F0,5v e seu efeito modulador ser linear, o que difere atividade modulatórios da F0,5v da atividade de outros inibidores clássicos como citrato, hidroxicitrato (Chung *et al.*, 2016) e polipeptídios ácidos (Montanari *et al.*, 2016), sugerindo que a F0,5v possa atuar por um ou mais mecanismo diferentes.

Diante destes resultados, perguntou-se por que a presença de F0,5v induziria a formação de tantos cristais?

Antes que essa pergunta possa ser respondida é preciso levar em consideração que a quantidade de cálcio livre ao término da cristalização não foi alterada pela adição de diferentes concentrações de F0,5v (Figura 17). Isso significa que a presença da F0,5v nas concentrações avaliadas não retirou cálcio do sistema, portanto todo o cálcio disponível para cristalização participou desse processo, o mesmo não ocorre quando se utiliza um inibidor clássico como citrato (Chutipongtanate e Thongboonkerd, 2010). Com isso, conclui-se que a massa total dos cristais formados é a mesma, tanto na presença como na ausência do inibidor. Logo, pode-se indicar que no caso da F0,5v sempre haverá uma relação inversamente proporcional entre o tamanho e o número dos cristais.

Voltando à pergunta, a sua resposta é complexa, mas pode começar a ser formulada a partir dos dados obtidos com os ensaios de avaliação individualizada da nucleação, da agregação e da sedimentação dos cristais CaOx (Figura 19). Nessa figura a nucleação pode ser visualizada na parte ascendente e o seu ápice (AbsMax) corresponde ao ponto onde se tem o número máximo de cristais possíveis de serem formados e que estão em suspensão (Baumann, Affolter e Casella, 2011; Baumann e Casella, 2019b). A partir desse ponto a agregação passa a superar a nucleação, os cristais pequenos (núcleos) se agregam, formam partículas maiores que se precipitam, e, conseqüentemente, a curva do gráfico começa a descender (Baumann, Affolter e Casella, 2011; Baumann e Casella, 2019b). Na Figura 19, quando se compara o gráfico obtido com o grupo controle e aqueles obtidos com as diferentes concentrações de F0,5v, verifica-se que o AbsMax, que no grupo controle era de ~6 minutos, passou a um valor em torno de 2 minutos. Situações como essa são observadas quando o agente modulador age induzindo a formação de mais cristais, porém, de cristais menores (Atmani e Khan, 2000; Moe e Xu, 2018; Sethmann *et al.*, 2017), o que corrobora com as observações vistas na microscopia de campo claro. Como os testes com a F0,5v ocorreram nas mesmas condições de temperatura e concentração de CaOx que no grupo controle, o

alto número de cristais formados na presença da F0,5v indica que a fração em questão induz a nucleação heterogênea, cuja barreira energética para a formação de núcleos é menor e mais núcleos são formados conseqüentemente (Khan *et al.*, 2016; Sethmann *et al.*, 2017).

A F0,5v é composta por moléculas grandes entre 232 e 174 kDa (Tabela 10) e carregadas negativamente. Moléculas com essas características são apontadas como agentes moduladores que servem como sítios para a nucleação heterogênea (Fang *et al.*, 2016). Portanto, sugere-se que os grupamentos negativos dos polissacarídeos presentes em F0,5v atraiam íons de cálcio e os imobilize. Posteriormente, os íons oxalato cobrem a camada de cálcio formada sobre os polissacarídeos e esse processo se repete até a formação do cristal, que contém em seu interior um ou mais moléculas de polissacarídeos. Como há mais moléculas dos componentes de F0,5v disponíveis, então formam-se muito mais núcleos do que no grupo controle, e conseqüentemente mais cristais.

Contudo, estes vários núcleos poderiam, posteriormente, na fase de agregação, se unirem, e conseqüentemente, o número de cristais não seria tão grande. E por que isso não ocorre?

Foi demonstrado mostrado que partículas com alto potencial zeta, seja ele negativo ou positivo, são menos propensas a se agregar, inclusive cristais de CaOx (Li, Xue e Ouyang, 2013; Queiroz *et al.*, 2015). E quando se avaliou o potencial zeta dos cristais formados na presença de F0,5v, observou-se que eles apresentam alto valor negativo para esse parâmetro, que é proveniente da presença dos polissacarídeos de F0,5v nos cristais. Acredita-se que esse valor negativo também deve ser observado nos pequenos cristais formados durante o processo de nucleação na presença de F0,5v, o que impediria uma taxa de agregação semelhante a observada no grupo controle.

A agregação dos núcleos de cristais é a segunda etapa da cristalização e tem início logo após a formação deles (Baumann e Affolter, 2012). A agregação geralmente acontece num período curto e é considerada uma etapa de grande importância para o processo de formação dos cálculos renais de CaOx nos modelos de placas de Randall ou plugs de Randall.

A velocidade sedimentação de partículas como os cristais num líquido depende, dentre outras coisas, do volume dos cristais (Baumann, Affolter e Meyer, 2010). Quanto maior os cristais, maior a velocidade de sedimentação. Os cristais formados na presença da F0,5v sedimentaram-se mais lentamente que os cristais do grupo controle, e esse atraso é explicado pelo tamanho menor que os primeiros possuem. Esse é um fato importante, pois cristais CaOx que se sedimentam lentamente são menos propensos a interagir entre si ou com cristais de fosfato de cálcio (Xie *et al.*, 2015) ou ácido úrico (Grases *et al.*, 2007) e formarem agregados grandes (Baumann e Affolter, 2014; Baumann e Casella, 2019b), que ficam retidos nos néfrons e podem iniciar a formação de cálculos renais (Robertson, 2017).

Outro fator importante para se entender seria a forma pela qual macromoléculas inibem o crescimento dos cristais. Esse evento é explicado pelo mecanismo de “*step pinning*” (Shtukenberg, Ward e Kahr, 2017), o qual está inserido no modelo de cristalização de Cabrera–Vermilyea (Burton, Cabrera e Frank, 1951). Nesse modelo, o cristal cresce por meio de etapas ou camadas, os ditos “*steps*”, que surgem numa região do cristal e se espalham cobrindo o resto da face dos cristais (Figura 32) com a deposição de novos íons.

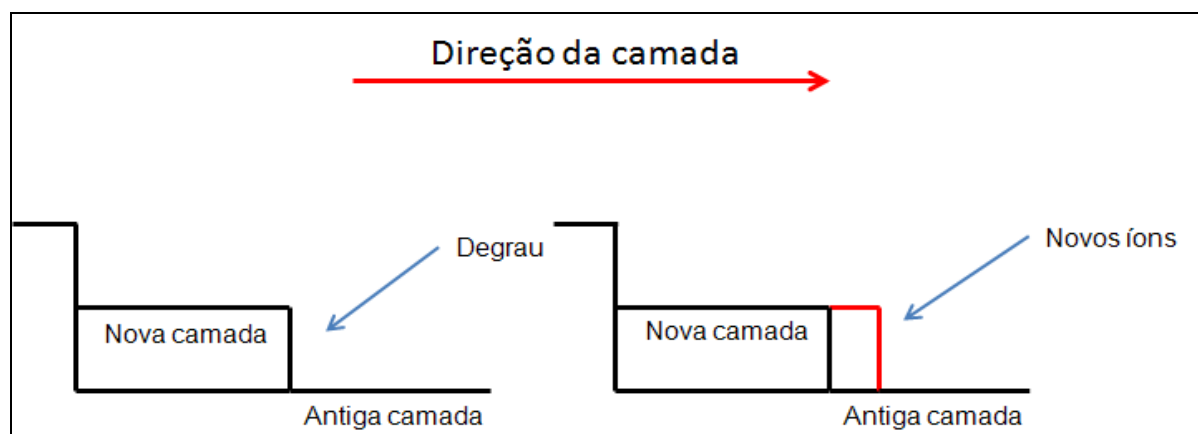


Figura 32. Esquema representando o modelo de crescimento de Cabrera–Vermilyea. Autoria própria.

Os inibidores como citrato e as macromoléculas adsorvem na camada antiga que está exposta e inibem a deposição de novos íons, criando falhas ou pontos de fixação (*step pinnings*), em que os íons de oxalato e cálcio não se depositam. Estes pontos desaceleram o crescimento da cada uma das as faces em que os inibidores adsorvem, o que resulta num crescimento anisotrópico (Figura 5) (Chien *et al.*, 2018; Grohe *et al.*, 2007).

Fatores gerais como temperatura, pH e força iônica influenciam a energia de ligação entre o inibidor e a face do cristal e conseqüentemente a tendência dos inibidores adsorverem-se aos cristais (Shtukenberg, Ward e Kahr, 2017). Porém, existe um fator específico que é crucial para entender o motivo pelo qual o mecanismo de ação da F0,5v não ocorre por adsorção aos cristais CaOx, o tempo de exposição da “camada antiga” ou terraço (Weaver *et al.*, 2010).

Termodinamicamente, o inibidor precisa ser mais “rápido” que os íons Ca e Ox para conseguir ligar-se e estabilizar-se sobre camada do cristal antes que ela seja “coberta” pela nova camada. Por isso, em sistemas de alta supersaturação, alguns inibidores de crescimento não tem ação (Robertson, 2017). Porém, quando as primeiras moléculas de inibidores conseguem adsorver à camada antiga, elas desaceleram o crescimento da nova camada e com isso deixam a camada antiga mais tempo exposta aos inibidores (Weaver *et al.*, 2010).

O aumento no tempo de exposição de cada camada antiga permite que mais moléculas do inibidor adsorvam na superficial do cristal, por isso há, em concentrações

baixas, um efeito sinérgico entre as moléculas do mesmo inibidor. Porém, conforme a concentração do inibidor aumenta, as suas moléculas começam a competir entre si pelos sítios de ligação mais favorável, de forma que o aumento da concentração do inibidor quase não gera mais inibição do crescimento (Chung *et al.*, 2016; Kolbach-Mandel, Kleinman e Wesson, 2015). Devido a esses fatores, a curva que relaciona a concentração de um inibidor e a inibição do crescimento costuma ser sigmoide e não linear, ao contrário da relação linear que foi observada nos resultados obtidos com a F0,5v. Logo a F0,5v, provavelmente, não atua se aderindo às faces dos cristais.

Além disso, os cristais formados na presença de F0,5v, independente da concentração, mantêm a relação entre o tamanho das faces e a morfologia bipiramidal (Figura 16), embora haja diferenças entre os COD formados na presença e na ausência da F0,5v. Então, ou a F0,5v ligam-se com a mesma especificidade em todas as faces do cristal ou não atua inibindo o crescimento do cristal. É provável que a F0,5v não atue aderindo às superfícies dos cristais e, portanto, essa observação seria mais uma evidência de que a F0,5v atua por um mecanismo diferente dos inibidores de crescimento geralmente descritos.

Contudo, tem-se que lembrar que, foi dito que o potencial zeta negativo dos cristais formados na presença da F0,5v (Tabela 6) indica a adsorção de polissacarídeo na superfície dos cristais. O que, *a priori*, contestaria a hipótese proposta anteriormente. Porém, como a avaliação do potencial zeta ocorre após o término da cristalização e não durante, é possível que a adsorção só ocorra sobre o cristal totalmente formado e por isso não modificaria o crescimento do cristal. Infelizmente, não se avaliou-se a capacidade da F0,5v adsorver sobre cristais CaOx já formados, o que poderia elucidar melhor essa questão e deve ser realizado no futuro.

Retomando a questão dos dados de contagem e medição dos cristais formados com as diferentes concentrações de F0,5v (Tabela 7), pode-se afirmar que o alto número de cristais de tamanho pequeno podem ser resultado de duas situações: da inibição do crescimento, que levaria a uma promoção da nucleação; ou da promoção da nucleação, que levaria a uma inibição do crescimento. Como a F0,5v não adere à superfície do cristal, é provável que ela seja um agente promotor da nucleação de cristais CaOx e a redução no tamanho dos cristais seja consequência. Fato que já foi observado com outros inibidores (Atmani e Khan, 2000; Nirala *et al.*, 2019).

As atividades *in vitro* da F0,5v são promissoras, porém antes de propor seu uso na prevenção ou tratamento dos cálculos renais são necessários ensaios de toxicidade, os quais compreendem ensaios iniciais em cultura de células e em animais.

A F0,5v em concentrações iguais ou superiores a 0,125 mg/mL induziu uma redução branda na viabilidade celular da MDCK (Figura 20) Porém, ao se analisar mais detalhadamente vê-se que as concentrações atóxicas da F0,5v, ou seja, abaixo de 0,125

mg/mL, são concentrações que fazem F0,5v ter ação moduladora na cristalização do CaOx *in vitro* e apontam para uma segurança no uso de F0,5v *in vivo*.

Todavia, o processo de formação dos cálculos renais não envolve apenas os cristais de CaOx, possivelmente há também a participação prévia do estresse oxidativo que lesiona o epitélio do túbulo renal e expõe o colágeno, favorecendo a deposição de matéria inorgânica (Daudon, Bazin e Letavernier, 2014). São evidências do papel do estresse oxidativo na urolitíase, entre outras coisas, a relação entre aumento dos marcadores do estresse oxidativo e a incidência de cálculos renais em seres humanos (Wozniak *et al.*, 2019) e o efeito benéfico do uso de antioxidante em pacientes com urolitíase (Nirumand *et al.*, 2018).

Seguindo essa linha de pensamento decidiu-se avaliar a atividade antioxidante da F0,5v.

A F0,5v foi capaz de sequestrar radicais e agir como doador de elétrons, características importantes para considerar um composto como agente antiurolítico (Golshan *et al.*, 2017; Kizivat *et al.*, 2017). A atividade antioxidante de frações obtidas de algas marina já foi descrita por diversos autores (Costa *et al.*, 2010; Mendes Marques *et al.*, 2019; Presa *et al.*, 2018) e foram obtidos valores de atividade antioxidante semelhantes aos descritos neste trabalho, e em todos os casos citados, a atividade antioxidante foi atribuída aos polissacarídeos presentes nas frações, o que leva à proposição de que a atividade antioxidante de F0,5v é decorrente dos seus polissacarídeos.

A atividade antioxidante *in vitro* ocorre é avaliada por meio de reações químicas em situações controladas, as quais nem sempre reproduzem de forma fidedigna às condições biológicas. Por isso, é importante confirmar a atividade antioxidante do composto utilizando um sistema biológico. Portanto, uma situação de estresse oxidativo foi simulada expondo células renais ao peróxido de hidrogênio, na presença ou não de diferentes concentrações de F0,5v. A adição da F0,5v antes ou depois da exposição ao H₂O₂ não mitigou o dano celular causado por essa molécula (Figura 21 e Figura 23). Porém, a presença da F0,5v concomitante ao H₂O₂ foi capaz de anular a diminuição da viabilidade celular causada pelo H₂O₂ (Figura 22). Indicando que a atividade antioxidante da F0,5v que foi observada *in vitro* também ocorre em célula e que a F0,5v pode ter atividade antiurolítica por se agente antioxidante.

O modelo em células de estresse oxidativo induzido por exposição ao H₂O₂ já foi utilizada anteriormente para avaliar a atividade antioxidante de outros polissacarídeos e tem sido observado diferentes momentos de ação dessas moléculas, o que provavelmente reflete a sua heterogeneidade estrutural. Wang e colaboradores (2015) observaram que o tratamento com polissacarídeos da planta *Cyclocarya paliurus* após a exposição ao H₂O₂, aumentava a viabilidade celular e a expressão de SOD em células RAW264.7. Já Liu e colaboradores (2017) observaram que o tratamento prévio de fibroblastos de pulmão humano

(MRC-5) com laminarinas era mais eficiente em aumentar a viabilidade celular e atividade de enzimas antioxidantes que o tratamento após o estresse provocado com H₂O₂. A utilização de H₂O₂ e oxalato de sódio foi utilizado por Santos e colaboradores (2016) para obter-se uma avaliação da atividade antioxidante mais voltada para a ação antiurolítica e foi demonstrado que os polissacarídeos da alga *Gracilaria Birdiae* são mais eficientes em proteger as células MDCK quando adicionados concomitantemente ao H₂O₂ do que previamente ou posteriormente, assim como foi observado neste trabalho.

Diante dos dados obtidos até o momento a F0,5v foi então submetida a processo de fracionamento por cromatografia de troca-iônica o que permitiu a obtenção de cinco subfrações: 0.2 M; 0.4 M; 0.5 M; 0.6 M; e 1.0 M.

As análises físico-químicas das frações confirmaram algumas observações. F0,5v é composto por mais de um polissacarídeo. A presença de heterofucana A é incontestável, inclusive na eletroforese ela aparece em todas as subfrações (Figura 25).

A subfração 0.2 M, que representam mais de um terço da massa total da fração cetônica (Figura 24), não apresentou bandas visíveis coradas com azul de toluidina. Isso, aliado ao fato de que ele foi eluído com baixa concentração de sal, dá indícios de que ela é constituída de polissacarídeos neutros ou pouco carregados negativamente. A sua composição monossacarídica, muito ácido urônico e glucose, enfatiza essa ideia, no caso os polissacarídeos neutros seriam laminarinas e os pouco carregados os ácidos alginicos. Corroborar com essa ideia o fato de 0.2 M possui duas populações de polissacarídeos, a primeira de cerca de 7 kDa (Tabela 10), o que é condizente com o tamanho molecular esperado para laminarinas (Bonfim-Mendonça *et al.*, 2017). E o segundo polissacarídeo que apresenta tamanho médio de 245 kDa (Tabela 10), o que é esperado para polissacarídeos mais complexos como o alginato (Rostami *et al.*, 2017).

Na eletroforese a subfração 0.4M apresentou duas bandas: uma com cor típica de polissacarídeo sulfatado e migração semelhante àquela esperada para a heterofucana A; e a outra, de menor tamanho, maior mobilidade e coloração menos intensa. Esse tipo de coloração e mobilidade eletroforética dessa banda é semelhante à de ácido alginico (Rocha *et al.*, 2005).

A heterofucana A está bem visível nas demais subfrações (0.5M; 0.6M; e 1.0M) na lâmina de eletroforese (Figura 25). Acredita-se que a heterofucana A seja uma manoglucogalactofucana ou uma manogalactoglucofucana, pois as quantidades de ácido glucurônico e galactose são muito semelhantes, com traços de manose e uma sulfatação por volta de 10%. Heterofucanas com essa composição e padrão de migração eletroforéticos já foram extraídas de algas marrons como *Sargassum filipendula* (Costa *et al.*, 2011) e *S. schröderi* (Leite *et al.*, 1998)

Avaliou-se individualmente os componentes da F0,5v com o objetivo de identificar qual era o principal responsável pela ação modulatória da cristalização. A adição das subfrações 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M e 1.0 M modularem bem pouco a cristalização do CaOx, quando comparadas com a subfração 0.2 M e a F0,5v não fracionada (Tabela 11).

A subfração 0.2 M parece ter um efeito muito semelhante ao da F0,5v, promovendo a formação de inúmeros cristais pequenos e todos do tipo COD (Figura 31), porém comparada com a F0,5v na mesma concentração (0,10 mg/mL) em número de cristais formados e tamanho dos cristais, a 0.2 M é menos potente (Tabela 11). Esse resultado foi desanimador por um lado, pois esperava-se que o efeito modulador fosse potencializado a partir do isolamento do agente, mas por outro lado demonstrou que o alginato ou a laminarina são os principais agentes modulatórios da cristalização, já que as amostras que os contém são as que possuem os efeitos moduladores mais potentes.

Alginatos são polissacarídeos altamente carboxilados, os radicais carboxila já foram descritos diversas vezes como os responsáveis pela ação modulatória da cristalização do CaOx de outros moduladores como osteopontina (Langdon e Grohe, 2016), citrato (Kolbach-Mandel, Kleinman e Wesson, 2015), glicosaminoglicanos (Poon e Gohel, 2012), inulina carboxilada (Akin *et al.*, 2008) e ácido poliacrílico (Thomas *et al.*, 2012), por isso a hipótese mais provável é que o alginato é o agente modulador e não as laminarinas.

A heterofucana A individualizada, presente nas subfrações 0.4 M, 0.5 M e 0.6 M, tem um efeito modulador diminuto, quando comparado ao alginato, porém a junção do alginato com a heterofucana na fração F0,5v parece criar uma ação sinérgica. Embora o percentual de ácido glucurônico na F0,5v seja bem menor que na 0.2 M, a F0,5v ainda é mais potente em modular a cristalização do CaOx, isso sugere que a junção de alginato e heterofucanas A é mais potente que qualquer um dos dois isoladamente.

Devido a esse provável efeito sinérgico concluímos que, do ponto de vista da atividade moduladora, não há justificativas para subfracionar a F0,5v e seguimos os experimentos de avaliação da ação modulatória da cristalização utilizando apenas com a F0,5v.

A atividade antioxidante das subfrações também foi avaliada para se determinar se do ponto de vista da atividade antioxidante, os componentes isolados da F0,5v teriam melhor efeito que a fração.

Todas as subfrações foram capazes de sequestrar radicais ou agirem como doadores de elétrons (Figura 27, Figura 28, Figura 29 e Figura 30) e podem ser consideradas como potenciais agentes antiurólítico. Todavia, os resultados das atividades antioxidantes revelaram que nenhuma das subfrações de F0,5v supera a atividade antioxidante da própria fração cetônica (F0,5v) de forma plena, isto é, em todas as vias do estresse oxidativo: iniciação, propagação e terminação. Mais uma vez os resultados indicam que subfracionar a

F0,5v não é vantajoso para potencializar a atividade desejada. Além disso, diminui o rendimento global da extração.

Aproveita-se esse espaço final da discussão para sumarizar os dados apresentados que indicam o potencial antiurolítico de F0,5v:

Cada uma das modificações que a F0,5v causa na cristalização do CaOx pode ter potencial de prevenir a urolitíase de alguma forma e será descrita abaixo.

A aceleração da formação dos cristais devido a nucleação heterógena consome rapidamente o oxalato disponível. Isso *in vivo* preveniria a exposição do epitélio renal à altas concentrações de oxalato, e por conseguinte, todos aqueles danos citados na Introdução como: integridade do epitélio renal e favorecimento da adesão de cristais CaOx (Kanlaya, Fong-ngern e Thongboonkerd, 2013; Kanlaya, Singhto e Thongboonkerd, 2016), a osteogênese/calcificação (Convento *et al.*, 2017) ou até mesmo indução da autofagia celular e criação de zonas de calcificação e deposição de cristais (Duan *et al.*, 2018).

A modulação da cristalização para que sejam formados apenas COD reduz a chance de revolvimento de cálculos renais, pois os COM são mais propensos a aderirem (Manissorn *et al.*, 2017) e/ou causarem dano ao epitélio (Sun *et al.*, 2015) e a formarem agregados (Chaiyarit e Thongboonkerd, 2017);

Por fim, a F0,5v pode neutralizar o potencial tóxico do oxalato de cálcio, pois os cristais que se formam sobre uma molécula de polissacarídeo da F0,5v “deixam de se formar” sob uma placa de Randall, ou sobre outros cristais (não se agregarem).

6. Conclusão

- Obteve-se da alga marrom *D. delicatula* cinco frações ricas em polissacarídeos sulfatados, pouco contaminadas por proteínas e compostos fenólicos;
- Todas as frações ricas em polissacarídeos sulfatados extraídas foram capazes de modular a cristalização do CaOx e aumentar a carga superficial negativa dos cristais formados;
- A F0,5v foi a fração com maior capacidade em modular a cristalização do CaOx e na sua presença foram formados apenas cristais do tipo COD;
- A presença da F0,5v em concentrações iguais ou superiores à 0,125 mg/mL reduzem a capacidade de células MDCK em reduzir o MTT em 20% em média;
- Adição da F0,5v (0,5 mg/mL) durante a exposição de células MDCK ao peróxido de hidrogênio aboliu o dano celular causado por esse;
- F0,5v foi fracionada por cromatografia de troca iônica em cinco diferentes subfrações de polissacarídeos;
- Dentre as subfrações, a 0.2 M teve a maior ação modulatórios da cristalização do CaOx, porém o efeito dessa fração não foi superior ao da F0,5v;
- Em relação a atividade antioxidante *in vitro* nenhuma subfração foi superior a F0,5v;
- A F0,5v não fracionada tem ação antioxidante *in vitro* maior que qualquer uma das suas subfrações;
- A F0,5v tem ação antirolítica atuando tanto na modulação da cristalização do CaOx como mitigando o estresse oxidativo.

7. Referências bibliográficas

ABDEL-AAL, E. A.; YASSIN, A. M. K.; EL-SHAHAT, M. F. Effect of crystallization parameters and presence of aqueous extract of *Nigella Sativa* on growth inhibition of calcium oxalate monohydrate particles. **Particulate Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 226–234, 2018.

AFSAR, B.; KIREMIT, M. C.; SAG, A. A.; TARIM, K.; ACAR, O.; ESEN, T.; SOLAK, Y.; COVIC, A.; KANBAY, M. The role of sodium intake in nephrolithiasis: epidemiology, pathogenesis, and future directions. **European Journal of Internal Medicine**, v. 35, p. 16–19, 2016.

AGGARWAL, K. P.; NARULA, S.; KAKKAR, M.; TANDON, C. Nephrolithiasis: Molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

AKIN, B.; ÖNER, M.; BAYRAM, Y.; DEMADIS, K. D. Effects of Carboxylate-Modified, “Green” Inulin Biopolymers on the Crystal Growth of Calcium Oxalate. **Cryst. Growth Des.**, v. 8, n. 6, p. 1997–2005, 2008.

ALBUQUERQUE, I. R. L.; QUEIROZ, K. C. S.; ALVES, L. G.; SANTOS, E. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 167–171, 2004.

ALE, M. T.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. **Marine drugs**, v. 9, n. 10, p. 2106–30, 2011.

ALELIGN, T.; PETROS, B. Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts. **Advances in Urology**, v. 2018, p. 1–12, 2018.

ALMEIDA-LIMA, J. *et al.* Evaluation of acute and subchronic toxicity of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan from the *Spatoglossum schröderi* in Wistar rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 674–679, ago. 2011.

ALVES, M. G. C. F.; DORE, C. M. P. G.; CASTRO, A. J. G.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K. M.; SORIANO, E. M.; BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, E. L. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1217–1227, 2012.

ANAN, G. *et al.* The impact of glycosylation of osteopontin on urinary stone formation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, 2020.

ANTONYUK, S. V.; STRANGE, R. W.; MARKLUND, S. L.; HASNAIN, S. S. The structure of human extracellular copper-zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding. **Journal of molecular biology**, v. 388, n. 2, p. 310–26, 1 maio 2009.

ATMANI, F.; KHAN, S. R. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. **BJU International**, v. 85, n. 6, p. 621–625, 2000.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Acta neurochirurgica. Supplement**, v. 98, p. 9–12, 2006.

AZEVEDO, C. A. A.; CARNEIRO, M. A. A.; OLIVEIRA, S. R.; MARINHO-SORIANO, E. Macroalgae as an indicator of the environmental health of the Pirangi reefs, Rio Grande do Norte, Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 323–328, 2011.

BAO, H.; CHOI, W.-S.; YOU, S. Effect of sulfated modification on the molecular characteristics and biological activities of polysaccharides from *Hypsizygus marmoreus*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 7, p. 1408–14, 2010.

BAUMANN, J. M.; AFFOLTER, B. New Pathophysiological Aspects of Growth and Prevention of Kidney Stones. **Advances in Urology**, v. 2012, p. 1–6, 2012.

BAUMANN, J. M.; AFFOLTER, B. From crystalluria to kidney stones, some physicochemical aspects of calcium nephrolithiasis. **World journal of nephrology**, v. 3, n. 4, p. 256–67, 2014.

BAUMANN, J. M.; AFFOLTER, B.; CASELLA, R. Aggregation of freshly precipitated calcium oxalate crystals in urine of calcium stone patients and controls. **Urological Research**, v. 39, n. 6, p. 421–427, 2011.

BAUMANN, J. M.; AFFOLTER, B.; MEYER, R. Crystal sedimentation and stone formation. **Urological Research**, v. 38, n. 1, p. 21–27, 2010.

BAUMANN, J. M.; CASELLA, R. Prevention of Calcium Nephrolithiasis: The Influence of Diuresis on Calcium Oxalate Crystallization in Urine. **Advances in Preventive Medicine**, v. 2019, p. 1–8, 2019a.

____. Prevention of Calcium Nephrolithiasis: The Influence of Diuresis on Calcium Oxalate Crystallization in Urine. **Advances in Preventive Medicine**, v. 2019, p. 1–8, 2019b.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay

applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–287, nov. 1971.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 29R-40R, jun. 2003.

BHADJA, P.; LUNAGARIYA, J.; OUYANG, J. Seaweed sulphated polysaccharide as an inhibitor of calcium oxalate renal stone formation. **Journal of Functional Foods**, 2016.

BIANCO, E. M.; PIRES, L.; SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; REIS, T. N. V.; VASCONCELOS, E. R. T. P. P.; COCENTINO, A. L. M.; NAVARRO, D. M. A. F. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 270–275, maio 2013.

BILAN, M. I.; USTYUZHANINA, N. E.; SHASHKOV, A. S.; THANH, T. T. T.; BUI, M. L.; TRAN, T. T. VAN; BUI, V. N.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. A sulfated galactofucan from the brown alga *Hormophysa cuneiformis* (Fucales, Sargassaceae). **Carbohydrate research**, v. 469, p. 48–54, nov. 2018.

BILLONES, D.; SANTOS, RICARDO; SANTOS, REMEDIOS. In Vitro Anticoagulant Activity of *Padina minor* (Yamada, 1925) Crude Aqueous Extract On Mice Blood. **Philippine Journal of Medicine**, v. v.4, n. n.1, 2017.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BIRD, V. Y.; KHAN, S. R. How do stones form? Is unification of theories on stone formation possible? **Archivos Espanoles de Urologia**, v. 70, n. 1, p. 12–27, 2017.

BLACK, W. A. P. Seaweeds and their value in foodstuffs. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 12, n. 1, p. 32–39, 28 mar. 1953.

BONFIM-MENDONÇA, P. DE S.; CAPOCI, I. R. G.; TOBALDINI-VALERIO, F. K.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Overview of β -glucans from *laminaria* spp.: Immunomodulation properties and applications on biologic models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017.

BORCHARDT-OTT, W. **Crystallography**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012.

BORGSTAHL, G. E.; PARGE, H. E.; HICKEY, M. J.; BEYER, W. F.; HALLEWELL, R. A.; TAINER, J. A. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. **Cell**, v. 71, n. 1, p. 107–18, 2 out. 1992.

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

BURTON, W. K.; CABRERA, N.; FRANK, F. C. The Growth of Crystals and the Equilibrium Structure of their Surfaces. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 243, n. 866, p. 299–358, 1951.

CAMARA, R. B. G.; COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; NOBRE, L. T. D. B.; DANTAS-SANTOS, N.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S. S. P.; ALVES, L. G.; ROCHA, H. A. O. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Marine Drugs**, v. 9, n. 1, p. 124–138, 2011.

CÁSSARO, C. M.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 7, p. 2254–61, 10 abr. 1977.

CHAIYARIT, S.; THONGBOONKERD, V. Defining and Systematic Analyses of Aggregation Indices to Evaluate Degree of Calcium Oxalate Crystal Aggregation. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. December, p. 1–9, 2017.

CHALE-DZUL, J.; MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. Hepatoprotective effect of the fucoidan from the brown seaweed *Turbinaria tricosata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 2123–2135, 19 out. 2015.

CHANDLER, S. F.; DODDS, J. H. The Effect of Phosphate, Nitrogen and Sucrose on the Production of Phenolics and Solasodine in Callus Cultures of *Solanum laciniatum*. **Plant Cell Reports**, v. 2, p. 205–208, 1983.

CHEN, M.-C.; HSU, W.-L.; HWANG, P.-A.; CHOU, T.-C. Low Molecular Weight Fucoidan Inhibits Tumor Angiogenesis through Downregulation of HIF-1/VEGF Signaling under Hypoxia. **Marine drugs**, v. 13, n. 7, p. 4436–51, 17 jul. 2015.

CHENG, J. J.; CHAO, C. H.; CHANG, P. C.; LU, M. K. Studies on anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from cultivated fungi *Antrodia cinnamomea*. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 37–45, 2016.

CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLLIEC-JOUAULT, S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohydrate research**, v. 330, n. 4, p. 529–35, 28 fev. 2001.

CHIEN, Y. C.; MANSOURI, A.; JIANG, W.; KHAN, S. R.; GRAY, J. J.; MCKEE, M. D. Modulation of calcium oxalate dihydrate growth by phosphorylated osteopontin peptides. **Journal of Structural Biology**, v. 204, n. 2, p. 131–144, 2018.

CHO, Y.-S.; JUNG, W.-K.; KIM, J.-A.; CHOI, I.-W.; KIM, S.-K. **Beneficial effects of fucoidan on osteoblastic MG-63 cell differentiation** *Food chemistry* [Amsterdam]: Elsevier Science, , 2009.

CHRISTMAS, K. G.; GOWER, L. B.; KHAN, S. R.; EL-SHALL, H. Aggregation and dispersion characteristics of calcium oxalate monohydrate: Effect of urinary species. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 256, n. 1, p. 168–174, 2002.

CHUNG, J.; GRANJA, I.; TAYLOR, M. G.; MPOURMPAKIS, G.; ASPLIN, J. R.; RIMER, J. D. Molecular modifiers reveal a mechanism of pathological crystal growth inhibition Crystalline materials are crucial to the function of living organisms, in the shells of molluscs. **Nature**, 2016.

CHUTIPONGTANATE, S.; THONGBOONKERD, V. Establishment of a novel colorimetric assay for high-throughput analysis of calcium oxalate crystal growth modulation. **The Analyst**, v. 135, n. 6, p. 1309–1314, 2010.

CONCHIE, J.; PERCIVAL, E. G. V. 167. Fucoidin. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 827, 1950.

CONVENTO, M. B.; PESSOA, E. A.; CRUZ, E.; GLÓRIA, M. A. DA; SCHOR, N.; BORGES, F. T. Calcium oxalate crystals and oxalate induce an epithelial-to-mesenchymal transition in the proximal tubular epithelial cells: Contribution to oxalate kidney injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–12, 2017.

COSTA, L. S. *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 21–28, 2010.

COSTA, L. S. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 952–966, 2011.

COSTA, M. S. S. P. **Polissacarídeos Sulfatados de Macroalgas Verdes: Correlação com**

Parâmetros Ambientais e Obtenção de Glucogalactanas Sulfatadas Anticoagulantes.

[s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

CUNHA, L.; GRENHA, A. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. **Marine drugs**, v. 14, n. 3, 25 fev. 2016.

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 471–474, jan. 2007.

DAUDON, M.; BAZIN, D.; LETAVERNIER, E. Randall's plaque as the origin of calcium oxalate kidney stones. **Urolithiasis**, v. 43, n. 1, p. 5–11, 2014.

DAUDON, M.; DORÉ, J. C.; JUNGERS, P.; LACOUR, B. Changes in stone composition according to age and gender of patients: A multivariate epidemiological approach. **Urological Research**, v. 32, n. 3, p. 241–247, 2004.

DAUDON, M.; LETAVERNIER, E.; FROCHOT, V.; HAYMANN, J. P.; BAZIN, D.; JUNGERS, P. Respective influence of calcium and oxalate urine concentration on the formation of calcium oxalate monohydrate or dihydrate crystals. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 11–12, p. 1504–1513, 2016.

DENIAUD-BOUËT, E.; KERVAREC, N.; MICHEL, G.; TONON, T.; KLOAREG, B.; HERVÉ, C. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: Insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. **Annals of Botany**, v. 114, n. 6, p. 1203–1216, 2014.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645–647, 1976.

DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D. DE; LEITE, E. L.; SILVA, L. F. DA; NADER, H. B. A new approach for the characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v. 108, n. 2, p. 143–153, 1995.

DISSAYABUTRA, T.; KALPONGNUKUL, N.; CHINDAPHAN, K.; SRISA-ART, M.; UNGJAROENWATHANA, W.; KAEWWONGSE, M.; IAMPENKHAE, K.; TOSUKHOWONG, P. Urinary sulfated glycosaminoglycan insufficiency and chondroitin sulfate supplement in urolithiasis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–10, 2019.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of

sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106–110, 1 jul. 1962.

DORE, C. M. P. G.; FAUSTINO ALVES, M. G. D. C.; POF??RIO WILL, L. S. E.; COSTA, T. G.; SABRY, D. A.; SOUZA R??GO, L. A. R. DE; ACCARDO, C. M.; ROCHA, H. A. O.; FILGUEIRA, L. G. A.; LEITE, E. L. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 467–475, 2013.

DUAN, X. *et al.* Autophagy inhibition attenuates hyperoxaluria-induced renal tubular oxidative injury and calcium oxalate crystal depositions in the rat kidney. **Redox Biology**, v. 16, n. January, p. 414–425, 2018.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ELIZONDO-GONZALEZ, R.; CRUZ-SUAREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; MENDOZA-GAMBOA, E.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; TREJO-AVILA, L. M. In vitro characterization of the antiviral activity of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus. **Virology journal**, v. 9, p. 307, 12 dez. 2012.

EPP, O.; LADENSTEIN, R.; WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. **European journal of biochemistry**, v. 133, n. 1, p. 51–69, 1 jun. 1983.

EVAN, A. P.; LINGEMAN, J. E.; COE, F. L.; PARKS, J. H.; BLEDSOE, S. B.; SHAO, Y.; SOMMER, A. J.; PATERSON, R. F.; KUO, R. L.; GRYNPAS, M. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 607–616, 2003.

EVAN, A. P.; WORCESTER, E. M.; COE, F. L.; WILLIAMS, J.; LINGEMAN, J. E. Mechanisms of human kidney stone formation. **Urolithiasis**, v. 43, n. 1, p. 19–32, 2014.

FANG, W.; ZHANG, H.; YIN, J.; YANG, B.; ZHANG, Y.; LI, J.; YAO, F. Hydroxyapatite Crystal Formation in the Presence of Polysaccharide. **Crystal Growth and Design**, v. 16, n. 3, p. 1247–1255, 2016.

FARIAS, W. R. L.; LIMA, P. C. W. C.; RODRIGUES, N. V. F. C.; SIQUEIRA, R. C. L.; AMORIM, R. M. F.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. S. A novel antinociceptive sulphated polysaccharide of the brown marine alga *Spatoglossum schroederi*. **Natural product**

communications, v. 6, n. 6, p. 863–6, jun. 2011.

FASANO, J. M.; KHAN, S. R. Intratubular crystallization of calcium oxalate in the presence of membrane vesicles: An in vitro study. **Kidney International**, v. 59, n. 1, p. 169–178, 2001.

FERNANDES-NEGREIROS, M. M.; ARAÚJO MACHADO, R. I.; BEZERRA, F. L.; NUNES MELO, M. C.; ALVES, M. G. C. F.; ALVES FILGUEIRA, L. G.; MORGANO, M. A.; TRINDADE, E. S.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A. O. Antibacterial, Antiproliferative, and Immunomodulatory Activity of Silver Nanoparticles Synthesized with Fucans from the Alga *Dictyota mertensii*. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 1, 25 dez. 2017.

FINLAYSON, B. Physicochemical aspects of urolithiasis. **Kidney International**, v. 13, n. 5, p. 344–360, 1978.

GAMA, M.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A. O. **Sulfated Polysaccharides**. [s.l.] Nova Science Publishers, Incorporated, 2015.

GAMBARO, G.; D'ANGELO, A.; FABRIS, A.; TOSETTO, E.; ANGLANI, F.; LUPO, A. Crystals, Randall's plaques and renal stones: Do bone and atherosclerosis teach us something? **Journal of Nephrology**, v. 17, n. 6, p. 774–777, 2004.

GE, Q.; RUAN, C. C.; MA, Y.; TANG, X. F.; WU, Q. H.; WANG, J. G.; ZHU, D. L.; GAO, P. J. Osteopontin regulates macrophage activation and osteoclast formation in hypertensive patients with vascular calcification. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 1–9, 2017.

GOLSHAN, A.; HAYATDAVOUDI, P.; HADJZADEH, M. A.-R.; KHAJAVI RAD, A.; MOHAMADIAN ROSHAN, N.; ABBASNEZHAD, A.; MOUSAVI, S. M.; PAKDEL, R.; ZAREI, B.; AGHAEI, A. Kidney stone formation and antioxidant effects of *Cynodon dactylon* decoction in male Wistar rats. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 180–190, 2017.

GOMES, D. L.; MELO, K. R. T.; QUEIROZ, M. F.; BATISTA, L. A. N. C.; SANTOS, P. C.; COSTA, M. S. S. P.; ALMEIDA-LIMA, J.; CAMARA, R. B. G.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A. O. In vitro studies reveal antiurolithic effect of antioxidant sulfated polysaccharides from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* var *flabellate*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 6, p. 1–16, 2019.

GRASES, F.; SANCHIS, P.; ISERN, B.; PERELLÓ, J.; COSTA-BAUZÁ, A. Uric acid as inducer of calcium oxalate crystal development. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 41, n. 1, p. 26–31, 2007.

GRASES, F.; SÖHNEL, O. Can Randall's plug composed of calcium oxalate form via the free particle mechanism? **BMC Urology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

GRASES, F.; SÖHNEL, O.; COSTA-BAUZA, A.; SERVERA, A.; BENEJAM, J. A Case of Randall's Plugs Associated to Calcium Oxalate Dihydrate Calculi. **Urology Case Reports**, v. 7, p. 37–38, 2016.

GROHE, B.; O'YOUNG, J.; IONESCU, D. A.; LAJOIE, G.; ROGERS, K. A.; KARTTUNEN, M.; GOLDBERG, H. A.; HUNTER, G. K. Control of calcium oxalate crystal growth by face-specific adsorption of an osteopontin phosphopeptide. **Journal of the American Chemical Society**, 2007.

GUERRA DORE, C. M. P.; FAUSTINO ALVES, M. G. C.; SANTOS, N. D.; CRUZ, A. K. M.; CÂMARA, R. B. G.; CASTRO, A. J. G.; GUIMARÃES ALVES, L.; NADER, H. B.; LISBOA LEITE, E. Antiangiogenic activity and direct antitumor effect from a sulfated polysaccharide isolated from seaweed. **Microvascular Research**, v. 88, p. 12–18, jul. 2013.

GUPTA, R. K.; PATEL, A. K.; SHAH, N.; CHAUDHARY, A. K.; JHA, U. K.; YADAV, U. C.; GUPTA, P. K.; PAKUWAL, U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 11, p. 4405–4409, 2014.

HIDARI, K. I. P. J.; TAKAHASHI, N.; ARIHARA, M.; NAGAOKA, M.; MORITA, K.; SUZUKI, T. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 376, n. 1, p. 91–5, 7 nov. 2008.

HIROSE, M.; YASUI, T.; OKADA, A.; HAMAMOTO, S.; SHIMIZU, H.; ITOH, Y.; TOZAWA, K.; KOHRI, K. Renal tubular epithelial cell injury and oxidative stress induce calcium oxalate crystal formation in mouse kidney. **International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association**, v. 17, n. 1, p. 83–92, 2010.

HUANG, C.-Y.; WU, S.-J.; YANG, W.-N.; KUAN, A.-W.; CHEN, C.-Y. Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1121–1129, abr. 2016.

HUANG, L.-S.; SUN, X.-Y.; GUI, Q.; OUYANG, J.-M. Effects of plant polysaccharides with different carboxyl group contents on calcium oxalate crystal growth. **CrystEngComm**, v. 19, n. 32, p. 4838–4847, 2017.

HWANG, P.-A.; HUNG, Y.-L.; PHAN, N. N.; HIEU, B.-T.-N.; CHANG, P.-M.; LI, K.-L.; LIN, Y.-C. The in vitro and in vivo effects of the low molecular weight fucoidan on the bone osteogenic

differentiation properties. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1349–1359, 14 ago. 2016.

HYAMS, E. S.; MATLAGA, B. R. Economic impact of urinary stones. **Translational Andrology and Urology**, v. 3, n. 3, p. 278–283, 2014.

IZATULINA, A. R.; GURZHIY, V. V.; KRZHIZHANOVSKAYA, M. G.; KUZ'MINA, M. A.; LEONI, M.; FRANK-KAMENETSKAYA, O. V. Hydrated Calcium Oxalates: Crystal Structures, Thermal Stability, and Phase Evolution. **Crystal Growth and Design**, v. 18, n. 9, p. 5465–5478, 2018.

JESUS RAPOSO, M. F.; MORAIS, A. M. B.; MORAIS, R. M. S. C. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. **Marine drugs**, v. 13, n. 5, p. 2967–3028, 15 maio 2015.

JIANG, Z.; OKIMURA, T.; YOKOSE, T.; YAMASAKI, Y.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Effects of sulfated fucan, ascophyllan, from the brown Alga *Ascophyllum nodosum* on various cell lines: a comparative study on ascophyllan and fucoidan. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 1, p. 113–7, jul. 2010.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196–223, 8 fev. 2011.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. STEPHEN. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196–233, 2011.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. STEPHEN. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine drugs**, v. 9, n. 2, p. 196–223, 8 fev. 2011.

JOSHI, S.; WANG, W.; PECK, A. B.; KHAN, S. R. Activation of the NLRP3 inflammasome in association with calcium oxalate crystal induced reactive oxygen species in kidneys. **Journal of Urology**, v. 193, n. 5, 2015.

KANLAYA, R.; FONG-NGERN, K.; THONGBOONKERD, V. Cellular adaptive response of distal renal tubular cells to high-oxalate environment highlights surface alpha-enolase as the enhancer of calcium oxalate monohydrate crystal adhesion. **Journal of Proteomics**, 2013.

KANLAYA, R.; SINGHTO, N.; THONGBOONKERD, V. EGCG decreases binding of calcium oxalate monohydrate crystals onto renal tubular cells via decreased surface expression of alpha-enolase. **J Biol Inorg Chem**, v. 21, p. 339–346, 2016.

KHAN, S. R.; PEARLE, M. S.; ROBERTSON, W. G.; GAMBARO, G.; CANALES, B. K.; DOIZI, S.; TRAXER, O.; TISELIUS, H.-G. Kidney stones. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n.

1, p. 16008, 25 dez. 2016.

KIM, B.-S.; YANG, S.-S.; YOU, H.-K.; SHIN, H.-I.; LEE, J. Fucoïdan-induced osteogenic differentiation promotes angiogenesis by inducing vascular endothelial growth factor secretion and accelerates bone repair. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 12, n. 3, p. e1311–e1324, 2018.

KIM, B. S.; KANG, H.-J.; PARK, J.-Y.; LEE, J. Fucoïdan promotes osteoblast differentiation via JNK- and ERK-dependent BMP2-Smad 1/5/8 signaling in human mesenchymal stem cells. **Experimental & molecular medicine**, v. 47, p. e128, 9 jan. 2015.

KIM, K.-J.; LEE, B.-Y. Fucoïdan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses adipocyte differentiation by inhibition of inflammation-related cytokines in 3T3-L1 cells. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 32, n. 6, p. 439–47, jun. 2012.

KIM, K.-J.; LEE, O.-H.; LEE, B.-Y. Fucoïdan, a sulfated polysaccharide, inhibits adipogenesis through the mitogen-activated protein kinase pathway in 3T3-L1 preadipocytes. **Life sciences**, v. 86, n. 21–22, p. 791–7, 22 maio 2010.

KIM, S.-H.; CHOI, D.-S.; ATHUKORALA, Y.; JEON, Y.-J.; SENEVIRATHNE, M.; CHO, K. R. **Antioxidant Activity of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sargassum fulvellum*** *Journal of Food Science and Nutrition*, 2007.

KIZIVAT, T.; SMOLIĆ, M.; MARIĆ, I.; TOLUŠIĆ LEVAK, M.; SMOLIĆ, R.; BILIĆ ČURČIĆ, I.; KUNA, L.; MIHALJEVIĆ, I.; VČEV, A.; TUCAK-ZORIĆ, S. Antioxidant Pre-Treatment Reduces the Toxic Effects of Oxalate on Renal Epithelial Cells in a Cell Culture Model of Urolithiasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 109, 23 jan. 2017.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *In*: BARNES, M. (Ed.). **Oceanography and Marine Biology**. v. 26 ed. [s.l.] Aberdeen University Press, 1988. p. 259–315.

KOCYIGIT, A.; SELEK, S. Exogenous Antioxidants are Double-edged Swords. **Bezmialem Science**, v. 4, n. 2, p. 70–75, 20 set. 2016.

KOH, H. S. A.; LU, J.; ZHOU, W. Structure characterization and antioxidant activity of fucoïdan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand. **Carbohydrate polymers**, v. 212, p. 178–185, 15 maio 2019.

KOLBACH-MANDEL, A. M.; KLEINMAN, J. G.; WESSON, J. A. Exploring calcium oxalate crystallization: a constant composition approach. **Urolithiasis**, v. 43, n. 5, p. 397–409, 2015.

KORDJAZI, M.; ETEMADIAN, Y.; SHABANPOUR, B.; POURASHOURI, P. Chemical composition antioxidant and antimicrobial activities of fucoidan extracted from two species of brown seaweeds (*Sargassum ilicifolium* and *Sargassum angustifolium*) around Qeshm Island. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 18, n. 3, 2019.

KORKES, F.; SILVA II, J. L. DA; HEILBERG, I. P. Costs for in hospital treatment of urinary lithiasis in the Brazilian public health system. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 4, p. 518–522, 2011.

LAMOUREUX, M. Observations sur la physiologie des algues marines, et description de cinq nouveaux genres de cette famille. **Nouveau Bulletin des Sciences**, n. 6, p. 330–333, 1809.

LANGDON, A.; GROHE, B. The osteopontin-controlled switching of calcium oxalate monohydrate morphologies in artificial urine provides insights into the formation of papillary kidney stones. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 296–306, 2016.

LEE, J.-B.; HAYASHI, K.; HASHIMOTO, M.; NAKANO, T.; HAYASHI, T. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 9, p. 1091–4, set. 2004.

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F. DA; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D. DE; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant Science**, v. 132, n. 2, p. 215–228, 1998.

LETAVERNIER, E.; VANDERMEERSCH, S.; TRAXER, O.; TLIQUI, M.; BAUD, L.; RONCO, P.; HAYMANN, J.-P.; DAUDON, M. Demographics and Characterization of 10,282 Randall Plaque-Related Kidney Stones. **Medicine**, v. 94, n. 10, p. e566, 2015.

LI, J. J.; XUE, J. F.; OUYANG, J. M. Stabilization of submicron calcium oxalate suspension by chondroitin sulfate C may be an efficient protection from stone formation. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2013, 2013.

LIM, Y. Y.; LEE, W.; GENOMICS, C.; NAMASIVAYAM, P.; ABDULLAH, J. O.; YIELD, A.; GENOME, S. Sulfated galactans from red seaweeds and their potential applications Sulfated Galactans From Red Seaweeds and Their Potential Applications. **Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews**, v. 4, n. March, p. 1–17, 2018.

LIU, S.; WANG, Q.; SONG, Y.; HE, Y.; REN, D.; CONG, H.; WU, L. Studies on the hepatoprotective effect of fucoidans from brown algae *Kjellmaniella crassifolia*. **Carbohydrate Polymers**, v. 193, p. 298–306, ago. 2018.

LIU, X.; LIU, H.; ZHAI, Y.; LI, Y.; ZHU, X.; ZHANG, W. Laminarin protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in MRC-5 cells possibly via regulating NRF2. **PeerJ**, v. 2017, n. 7, p. e3642, 31 jul. 2017.

LU, J. *et al.* Fucoidan Extracted from the New Zealand *Undaria pinnatifida*-Physicochemical Comparison against Five Other Fucoidans: Unique Low Molecular Weight Fraction Bioactivity in Breast Cancer Cell Lines. **Marine drugs**, v. 16, n. 12, 22 nov. 2018.

MAGALHAES, K. D. *et al.* Anticoagulant, antioxidant and antitumor activities of heterofucans from the seaweed *dictyopteris delicatula*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3352–3365, 2011.

MAGDEL-DIN HUSSEIN, M.; ABDEL-AZIZ, A.; MOHAMED SALEM, H. Some structural features of a new sulphated heteropolysaccharide from *Padina pavonia*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 10, p. 2133–2135, jan. 1980.

MANISSORN, J.; FONG-NGERN, K.; PEERAPEN, P.; THONGBOONKERD, V. Systematic evaluation for effects of urine pH on calcium oxalate crystallization, crystal-cell adhesion and internalization into renal tubular cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

MARAIS, M. F.; JOSELEAU, J. P. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydrate research**, v. 336, n. 2, p. 155–9, 8 nov. 2001.

MEENAKSHI, S.; UMayAPARVATHI, S.; SARAVANAN, R.; MANIVASAGAM, T.; BALASUBRAMANIAN, T. Hepatoprotective effect of fucoidan isolated from the seaweed *Turbinaria decurrens* in ethanol intoxicated rats. **International journal of biological macromolecules**, v. 67, p. 367–72, jun. 2014.

MELO-SILVEIRA, R. F.; FIDELIS, G. P.; PEREIRA COSTA, M. S. S.; TELLES, C. B. S.; DANTAS-SANTOS, N.; OLIVEIRA ELIAS, S. DE; RIBEIRO, V. B.; BARTH, A. L.; MACEDO, A. J.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. In vitro antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 409–426, 2012.

MELO, K. R. T.; CAMARA, R. B. G.; QUEIROZ, M. F.; VIDAL, A. A. J.; LIMA, C. R. M.; MELO-SILVEIRA, R. F.; ALMEIDA-LIMA, J.; ROCHA, H. A. O. Evaluation of sulfated polysaccharides

from the brown seaweed dictyopteris justii as antioxidant agents and as inhibitors of the formation of calcium oxalate crystals. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 14543–14563, 2013.

MENA, S.; ORTEGA, A.; ESTRELA, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 36–44, 2009.

MENDES MARQUES, M. L.; PRESA, F. B.; SILVA VIANA, R. L.; PEREIRA COSTA, M. S. S.; ROCHA AMORIM, M. O.; BELLAN, D. L.; CHAGAS FAUSTINO ALVES, M. G.; COSTA, L. S.; TRINDADE, E. S.; OLIVEIRA ROCHA, H. A. Anti-thrombin, anti-adhesive, anti-migratory, and anti-proliferative activities of sulfated galactans from the tropical green seaweed, udotea flabellum. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, 2019.

MENEZES, M. M.; NOBRE, L. T. D. B.; ROSSI, G. R.; ALMEIDA-LIMA, J.; MELO-SILVEIRA, R. F.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A. O. A low-molecular-weight galactofucan from the seaweed, Spatoglossum schröederi, binds fibronectin and inhibits capillary-like tube formation in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 1067–1075, maio 2018.

MIAN, A. J.; PERCIVAL, E. Carbohydrates of the brown seaweeds himanthalia lorea, bifurcaria bifurcata, and Padina pavonia. **Carbohydrate Research**, v. 26, n. 1, p. 133–146, jan. 1973.

MO, L.; LIAW, L.; EVAN, A. P.; SOMMER, A. J.; LIESKE, J. C.; WU, X. R. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking osteopontin, Tamm-Horsfall protein, or both. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 293, n. 6, p. 1935–1943, 2007.

MOE, O. W.; XU, L. H. R. Hyperuricosuric calcium urolithiasis. **Journal of Nephrology**, v. 31, n. 2, p. 189–196, 2018.

MONGA, M. Climate-related increase in the prevalence of urolithiasis in the United States: Editorial comment. **International Braz J Urol**, v. 34, n. 4, p. 517, 2008.

MONTANARI, G.; LAKSHTANOV, L. Z.; TOBLER, D. J.; DIDERIKSEN, K.; DALBY, K. N.; BOVET, N.; STIPP, S. L. S. Effect of Aspartic Acid and Glycine on Calcite Growth. **Crystal Growth and Design**, v. 16, n. 9, p. 4813–4821, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

NAKAZATO, K.; TAKADA, H.; IHA, M.; NAGAMINE, T. Attenuation of N-nitrosodiethylamine-induced liver fibrosis by high-molecular-weight fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus*. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 25, n. 10, p. 1692–1701, out. 2010.

NEELAKANDAN, Y.; VENKATESAN, A. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of sulfated polysaccharide fractions from *Sargassum wightii* and *Halophila ovalis* in male Wistar rats. **Indian journal of pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 562–570, 2016.

NEGREIROS, M. M. F.; ALMEIDA-LIMA, J.; ROCHA, H. A. O. Sulfated Polysaccharides from Unusual Natural Sources. *In*: GAMA, M.; NADER, H. B.; ROCHA, H A O (Eds.). . **Sulfated Polysaccharides**. [s.l.] Nova Science Publishers, Incorporated, 2015. .

NIRALA, R. K.; DUTTA, P.; MALIK, M. Z.; DWIVEDI, L.; SHRIVASTAV, T. G.; THAKUR, S. C. In Vitro and In Silico Evaluation of Betulin on Calcium Oxalate Crystal Formation. **Journal of the American College of Nutrition**, p. 1–11, abr. 2019.

NIRUMAND, M. C.; HAJIALYANI, M.; RAHIMI, R.; FARZAEI, M. H.; ZINGUE, S.; NABAVI, S. M.; BISHAYEE, A. Dietary plants for the prevention and management of kidney stones: Preclinical and clinical evidence and molecular mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, 2018.

NISHINO, T.; TAKABE, Y.; NAGUMO, T. **Isolation and partial characterization of a novel beta-D-galactan sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* var. *longissima*** **Carbohydrate polymers**, 1994.

NISHINO, T.; YAMAUCHI, T.; HORIE, M.; NAGUMO, T.; SUZUKI, H. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. **Thrombosis research**, v. 99, n. 6, p. 623–34, 15 set. 2000.

OLIVEIRA, C.; FERREIRA, A. S.; NOVOA-CARBALLAL, R.; NUNES, C.; PASHKULEVA, I.; NEVES, N. M.; COIMBRA, M. A.; REIS, R. L.; MARTINS, A.; SILVA, T. H. The Key Role of Sulfation and Branching on Fucoidan Antitumor Activity. **Macromolecular bioscience**, v. 17, n. 5, 2017.

OUYANG, J. M.; WANG, M.; LU, P.; TAN, J. Degradation of sulfated polysaccharide extracted from algal *Laminaria japonica* and its modulation on calcium oxalate crystallization. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 7, p. 1022–1029, 2010.

PAIVA, A. **Prospecção de polissacarídeos bioativos da alga *Lobophora variegata* e**

elucidación estructural de una de suas β -glucanas. [s.l: s.n.].

PARK, M.-K.; JUNG, U.; ROH, C. Fucoidan from marine brown algae inhibits lipid accumulation. **Marine drugs**, v. 9, n. 8, p. 1359–67, 2011.

PARK, S.-J.; LEE, K. W.; LIM, D.-S.; LEE, S. The sulfated polysaccharide fucoidan stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. **Stem cells and development**, v. 21, n. 12, p. 2204–11, 10 ago. 2012.

PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 29, p. 21770–6, 15 out. 1993.

PATEL, N.; BROWN, R. D.; SARKISSIAN, C.; DE, S.; MONGA, M. Quality of life and urolithiasis: The patient - reported outcomes measurement information system (PROMIS). **International Braz J Urol**, v. 43, n. 5, p. 880–886, 2017.

PATIL, N. P.; LE, V.; SLIGAR, A. D.; MEI, L.; CHAVARRIA, D.; YANG, E. Y.; BAKER, A. B. Algal Polysaccharides as Therapeutic Agents for Atherosclerosis. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 5, p. 153, 2018.

PENG, Y.; WANG, Y.; WANG, Q.; LUO, X.; HE, Y.; SONG, Y. Hypolipidemic effects of sulfated fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia* through modulating the cholesterol and aliphatic metabolic pathways. **Journal of Functional Foods**, v. 51, p. 8–15, dez. 2018.

PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides.** [s.l.] Academic Press, 1967.

PEREZ G., R. M.; AVILA A., J. G.; PEREZ G., S.; MARTINEZ C., A.; MARTINEZ C., G. Antimicrobial activity of some american algae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 111–116, abr. 1990.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PONCE, N. M. A.; FLORES, M. L.; PUJOL, C. A.; BECERRA, M. B.; NAVARRO, D. A.; CÓRDOBA, O.; DAMONTE, E. B.; STORTZ, C. A. Fucoidans from the phaeophyta *Scytosiphon lomentaria*: Chemical analysis and antiviral activity of the galactofucan component. **Carbohydrate Research**, v. 478, p. 18–24, maio 2019.

POON, N. W.; GOHEL, M. D. I. Urinary glycosaminoglycans and glycoproteins in a calcium

oxalate crystallization system. **Carbohydrate Research**, v. 347, n. 1, p. 64–68, 2012.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V.; RHODES, C. J.; VALKO, M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 7, p. 592–607, 2017.

PRESA, F. B.; MARQUES, M. L. M.; VIANA, R. L. S.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, L. S.; ROCHA, H. A. O. The Protective role of sulfated polysaccharides from green seaweed *udotea flabellum* in cells exposed to oxidative damage. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p. 1–16, 2018.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337–41, maio 1999.

QUEIROZ, M. F.; MELO, K. R. T.; SABRY, D. A.; SASSAKI, G. L.; ROCHA, H. A. O. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? **Marine Drugs**, 2015.

RATKALKAR, V. N.; KLEINMAN, J. G. Mechanisms of stone formation. **Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism**, v. 9, n. 3–4, p. 187–197, 2011.

RILEY, J. M.; KIM, H.; AVERCH, T. D.; KIM, H. J. Effect of magnesium on calcium and oxalate ion binding. **Journal of Endourology**, v. 27, n. 12, p. 1487–1492, 1 dez. 2013.

RIMER, J. D.; KOLBACH-MANDEL, A. M.; WARD, M. D.; WESSON, J. A. The role of macromolecules in the formation of kidney stones. **Urolithiasis**, v. 45, n. 1, p. 57–74, 2017.

ROBERTSON, W. G. Potential role of fluctuations in the composition of renal tubular fluid through the nephron in the initiation of Randall's plugs and calcium oxalate crystalluria in a computer model of renal function. **Urolithiasis**, v. 43, n. 1, p. 93–107, 2014.

ROBERTSON, W. G. Do “inhibitors of crystallisation” play any role in the prevention of kidney stones? A critique. **Urolithiasis**, v. 45, n. 1, p. 43–56, 2017.

ROCHA AMORIM, M. O.; LOPES GOMES, D.; DANTAS, L. A.; SILVA VIANA, R. L.; CHIQUETTI, S. C.; ALMEIDA-LIMA, J.; SILVA COSTA, L.; OLIVEIRA ROCHA, H. A. Fucan-coated silver nanoparticles synthesized by a green method induce human renal adenocarcinoma cell death. **International journal of biological macromolecules**, v. 93, n. Pt A, p. 57–65, dez. 2016.

ROCHA, H. A.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; VEIGA, S. S.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Fucan inhibits Chinese hamster ovary cell (CHO) adhesion to fibronectin

by binding to the extracellular matrix. **Planta medica**, v. 71, n. 7, p. 628–33, jul. 2005.

ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; CARVALHO, L. C. M.; VEIGA, S. S.; LEITE, E. L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 5, p. 621–626, maio 2001.

ROCHA, H. A. O.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. C.; TORQUATO, R. J. S.; VEIGA, S. S.; VALENTE, A. P.; MOURÃO, P. A. S.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spagtoglossum schroederi*: An ideal antithrombotic agent? **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41278–41288, 2005.

ROMERO, V.; AKPINAR, H.; ASSIMOS, D. G. Kidney Stones: A Global Picture of Prevalence, Incidence, and Associated Risk Factors Kidney Stones: A Global Perspective. **REVIEWS IN UROLOGY [Rev Urol]**, v. 1212, n. 23, p. 86–96, 2010.

ROSTAMI, Z.; TABARSA, M.; YOU, S.; REZAEI, M. Relationship between molecular weights and biological properties of alginates extracted under different methods from *Colpomenia peregrina*. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 289–297, jul. 2017.

RUIZ-AGUDO, E.; BURGOS-CARA, A.; RUIZ-AGUDO, C.; IBAÑEZ-VELASCO, A.; CÖLFEN, H.; RODRIGUEZ-NAVARRO, C. A non-classical view on calcium oxalate precipitation and the role of citrate. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

SAKHAEI, K.; MAALOUF, N. M.; KUMAR, R.; PASCH, A.; MOE, O. W. Nephrolithiasis-associated bone disease: pathogenesis and treatment options. **Kidney International**, v. 79, n. 4, p. 393–403, fev. 2011.

SANJEEWA, K. K. A.; FERNANDO, I. P. S.; KIM, S.-Y.; KIM, H.-S.; AHN, G.; JEE, Y.; JEON, Y.-J. In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of high molecular weight sulfated polysaccharide; containing fucose separated from *Sargassum horneri*: Short communication. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, n. Pt A, p. 803–807, fev. 2018.

SANTOS, P. C. **Obtenção de Polissacarídeos Sulfatados da Alga Vermelha Comestível *Gracilaria Birdiae* e sua Influência na Formação e Morfologia de Cristais de Oxalato de Cálcio.** [s.l: s.n.].

SEAR, R. P. Nucleation: Theory and applications to protein solutions and colloidal

suspensions. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 19, n. 3, 2007.

SETHMANN, I.; WENDT-NORDAHL, G.; KNOLL, T.; ENZMANN, F.; SIMON, L.; KLEEBE, H. J. Microstructures of Randall's plaques and their interfaces with calcium oxalate monohydrate kidney stones reflect underlying mineral precipitation mechanisms. **Urolithiasis**, v. 45, n. 3, p. 235–248, 2017.

SHARMA, G. N.; GUPTA, G.; SHARMA, P. A Comprehensive Review of Free Radicals, Antioxidants, and Their Relationship with Human Ailments. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 28, n. 2, p. 139–154, 2018.

SHEN, P.; YIN, Z.; QU, G.; WANG, C. 11 - Fucoidan and Its Health Benefits. *In*: QIN, Y. (Ed.). **Bioactive Seaweeds for Food Applications**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 223–238.

SHENG, X.; WARD, M. D.; WESSON, J. A. Crystal surface adhesion explains the pathological activity of calcium oxalate hydrates in kidney stone formation. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 16, n. 7, p. 1904–8, 2005.

SHIBATA, H.; IIMURO, M.; UCHIYA, N.; KAWAMORI, T.; NAGAOKA, M.; UEYAMA, S.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Preventive Effects of Cladosiphon Fucoidan Against Helicobacter pylori Infection in Mongolian gerbils. **Helicobacter**, v. 8, n. 1, p. 59–65, fev. 2003.

SHIBATA, H.; KIMURA-TAKAGI, I.; NAGAOKA, M.; HASHIMOTO, S.; AIYAMA, R.; IHA, M.; UEYAMA, S.; YOKOKURA, T. Properties of fucoidan from Cladosiphon okamuranus tokida in gastric mucosal protection. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 11, n. 4, p. 235–45, 2000.

SHTUKENBERG, A. G.; WARD, M. D.; KAHR, B. Crystal Growth with Macromolecular Additives. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 24, p. 14042–14090, 2017.

SILCHENKO, A. S.; KUSAYKIN, M. I.; KURILENKO, V. V.; ZAKHARENKO, A. M.; ISAKOV, V. V.; ZAPOROZHETS, T. S.; GAZHA, A. K.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Hydrolysis of fucoidan by fucoidanase isolated from the marine bacterium, Formosa algae. **Marine drugs**, v. 11, n. 7, p. 2413–30, 11 jul. 2013.

SILVA, T. M. A.; ALVES, L. G.; QUEIROZ, K. C. S. DE; SANTOS, M. G. L.; MARQUES, C. T.; CHAVANTE, S. F.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed Padina gymnospora. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 523–533, 2005.

SKRIPTSOVA, A. V.; SHEVCHENKO, N. M.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; IMBS, T. I. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p. 79–86, 22 fev. 2010.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1057–1060, jan. 1989.

SOARES, A. R.; ROBAINA, M. C. S.; MENDES, G. S.; SILVA, T. S. L.; GESTINARI, L. M. S.; PAMPLONA, O. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; KAISER, C. R.; ROMANOS, M. T. V. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 714–723, ago. 2012.

SOCHA, K.; KOCHANOWICZ, J.; KARPIŃSKA, E.; SOROCZYŃSKA, J.; JAKONIUK, M.; MARIK, Z.; BORAWSKA, M. H. Dietary habits and selenium, glutathione peroxidase and total antioxidant status in the serum of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Nutrition journal**, v. 13, p. 62, 18 jun. 2014.

SOFIA, N. H.; WALTER, T. M.; SANATORIUM, T. Commerce Medical Science PREVALENCE AND RISK FACTORS OF KIDNEY STONE Lecturer , Department of Maruthuvam (Medicine) National Institute of Ex- Director , National Institute of Siddha , Tambaram Sanatorium , n. March, p. 1–6, 2016.

SOROKIN, I.; MAMOULAKIS, C.; MIYAZAWA, K.; RODGERS, A.; TALATI, J.; LOTAN, Y. Epidemiology of stone disease across the world. **World Journal of Urology**, v. 35, n. 9, p. 1301–1320, 17 set. 2017.

ŠTER, A.; ŠAFRANKO, S.; BILIĆ, K.; MARKOVIĆ, B.; KRALJ, D. The effect of hydrodynamic and thermodynamic factors and the addition of citric acid on the precipitation of calcium oxalate dihydrate. **Urolithiasis**, v. 46, n. 3, p. 243–256, 2018.

SUN, X. Y.; OUYANG, J. M.; LIU, A. J.; DING, Y. M.; GAN, Q. Z. Preparation, characterization, and in vitro cytotoxicity of COM and COD crystals with various sizes. **Materials Science and Engineering C**, v. 57, p. 147–156, 2015.

TAINER, J. A.; GETZOFF, E. D.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. **Nature**, v. 306, n. 5940, p. 284–287, nov. 1983.

TARAFDAR, A.; PULA, G. The role of NADPH oxidases and oxidative stress in

neurodegenerative disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

TAWATSUPA, B. *et al.* Association between occupational heat stress and kidney disease among 37 816 workers in the thai cohort study (TCS). **Journal of Epidemiology**, v. 22, n. 3, p. 251–260, 2012.

TEFEKLI, A.; CEZAYIRLI, F. The History of Urinary Stones: In Parallel with Civilization. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–5, 20 nov. 2013.

THOMAS, A.; ROSSEEVA, E.; HOCHREIN, O.; CARRILLO-CABRERA, W.; SIMON, P.; DUCHSTEIN, P.; ZAHN, D.; KNIEP, R. Mimicking the growth of a pathologic biomineral: Shape development and structures of calcium oxalate dihydrate in the presence of polyacrylic acid. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 13, p. 4000–4009, 2012.

USTYUZHANINA, N. E.; BILAN, M. I.; GERBST, A. G.; USHAKOVA, N. A.; TSVETKOVA, E. A.; DMITRENOK, A. S.; USOV, A. I.; NIFANTIEV, N. E. Anticoagulant and antithrombotic activities of modified xylofucan sulfate from the brown alga *Punctaria plantaginea*. **Carbohydrate polymers**, v. 136, p. 826–33, 20 jan. 2016.

VASCONCELOS, J. B.; VASCONCELOS, E. R. T. P. P.; BEZERRA, P. S. Screening for Antioxidant Capacity of Tropical Reef Seaweeds: Prospection for New Natural Antioxidants. **Screening for Antioxidant Capacity of Tropical Reef Seaweeds: Prospection for New Natural Antioxidants**, v. 45, n. 2, p. 16–30, 2017.

VINAIPHAT, A.; ALUKSANASUWAN, S.; MANISSORN, J.; SUTTHIMETHAKORN, S.; THONGBOONKERD, V. Response of renal tubular cells to differential types and doses of calcium oxalate crystals: Integrative proteome network analysis and functional investigations. **Proteomics**, v. 17, n. 15–16, p. 15–16, 2017.

VISWANATHAN, P.; RIMER, J. D.; KOLBACH, A. M.; WARD, M. D.; KLEINMAN, J. G.; WESSON, J. A. Calcium oxalate monohydrate aggregation induced by aggregation of desialylated Tamm-Horsfall protein. **Urological Research**, v. 39, n. 4, p. 269–282, 2011.

WAIKAR, S. S. *et al.* Association of Urinary Oxalate Excretion with the Risk of Chronic Kidney Disease Progression. **JAMA Internal Medicine**, v. 179, n. 4, p. 542–551, 2019.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International journal of biological macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127–32, 1 mar. 2008.

WANG, L.; WANG, X.; WU, H.; LIU, R. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. **Marine Drugs**, v. 12, n. 9, p. 4984–5020, 2014.

WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, B.; YAO, J.; WANG, Y. Structure-antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. **International journal of biological macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 59–66, 1 jan. 2010.

WANG, Z.-J.; XIE, J.-H.; KAN, L.-J.; WANG, J.-Q.; SHEN, M.-Y.; LI, W.-J.; NIE, S.-P.; XIE, M.-Y. Sulfated polysaccharides from *Cyclocarya paliurus* reduce H₂O₂-induced oxidative stress in RAW264.7 cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 80, p. 410–7, set. 2015.

WEAVER, M. L.; QIU, S. R.; FRIDDLE, R. W.; CASEY, W. H.; YOREO, J. J. DE. How the overlapping time scales for peptide binding and terrace exposure lead to nonlinear step dynamics during growth of calcium oxalate monohydrate. **Crystal Growth and Design**, v. 10, n. 7, p. 2954–2959, 2010.

WESSON, J. A. Osteopontin Is a Critical Inhibitor of Calcium Oxalate Crystal Formation and Retention in Renal Tubules. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 139–147, 2003.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 765–792, 2016.

WOODARD, L. E.; WELCH, R. C.; VEACH, R. A.; BECKERMANN, T. M.; SHA, F.; WEINMAN, E. J.; IKIZLER, T. A.; TISCHFIELD, J. A.; SAHOTA, A.; WILSON, M. H. Metabolic consequences of cystinuria. **BMC Nephrology**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2019.

WOZNIAK, P.; KONTEK, B.; SKALSKI, B.; KRÓ, A.; RÓZANSKI, W.; OLAS, B. Oxidative stress and hemostatic parameters in patients with nephrolithiasis before and after ureteroscopic lithotripsy. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. JUN, p. 1–8, 2019.

WU, L.; SUN, J.; SU, X.; YU, QIULI; YU, QIUYANG; ZHANG, P. A review about the development of fucoidan in antitumor activity: Progress and challenges. **Carbohydrate polymers**, v. 154, p. 96–111, 10 dez. 2016.

XIE, B.; HALTER, T. J.; BORAH, B. M.; NANCOLLAS, G. H. Aggregation of calcium phosphate and oxalate phases in the formation of renal stones. **Crystal Growth and Design**, v. 15, n. 1, p. 204–211, 2015.

XU, Y.; XU, J.; GE, K.; TIAN, Q.; ZHAO, P.; GUO, Y. Anti-inflammatory effect of low molecular weight fucoidan from *Saccharina japonica* on atherosclerosis in apoE-knockout mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, n. Pt A, p. 365–374, 15 out. 2018.

ZARGARZADEH, M.; AMARAL, A. J. R.; CUSTÓDIO, C. A.; MANO, J. F. Biomedical applications of laminarin. **Carbohydrate Polymers**, v. 232, p. 115774, mar. 2020.

ZATELLI, G. A.; PHILIPPUS, A. C.; FALKENBERG, M. An overview of odoriferous marine seaweeds of the Dictyopteris genus: insights into their chemical diversity, biological potential and ecological roles. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 2, p. 243–260, 2018.

ZAYED, A.; HAHN, T.; FINKELMEIER, D.; BURGER-KENTISCHER, A.; RUPP, S.; KRÄMER, R.; ULBER, R. Phenomenological investigation of the cytotoxic activity of fucoidan isolated from *Fucus vesiculosus*. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 182–187, jun. 2019.

ZHANG, C.-Y.; WU, W.-H.; WANG, J.; LAN, M.-B. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on calcium oxalate crystallization. **Marine drugs**, v. 10, n. 1, p. 119–30, jan. 2012.

ZHANG, C.; MIAO, Z.; WANG, X.; WU, W. The Polysaccharide from the Seaweed *Sargassum Graminifolium* and its Effect on Calcium Oxalate Crystallization based on Determination of Electrical Conductivity. n. Itms, p. 1–3, 2015.

ZHANG, C.; SHOW, P.-L.; HO, S.-H. Progress and perspective on algal plastics – A critical review. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121700, out. 2019.

ZHANG, C. Y.; WU, W. H.; WANG, J.; LAN, M. B. Antioxidant properties of polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and its effects on calcium oxalate crystallization. **Marine Drugs**, v. 10, n. 1, p. 119–130, 2012.

ZHAO, R. Z.; JIANG, S.; ZHANG, L.; YU, Z. BIN. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 1, p. 3–15, 2019.

ZHAO, X.; GUO, F.; HU, J.; ZHANG, L.; XUE, C.; ZHANG, Z.; LI, B. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. **Thrombosis research**, v. 144, p. 46–52, ago. 2016.

ZHOU, J.; HU, N.; WU, Y.; PAN, Y.; SUN, C. Preliminary studies on the chemical

characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 9, p. 721–7, set. 2008.

ZMYŚLONY, M.; PAWLACZYK-ŁUSZCZYŃSKA, M. Reactive Oxygen Species Produced by Physical Agents. **Comments on Toxicology**, v. 9, n. 1, p. 49–57, 2003.