



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

HUGO WESCLEY BARROS ALMEIDA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PARCIAL E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DO ALGINATO OBTIDO DA ALGA MARROM *LOBOPHORA
VARIEGATA* (LAMOUROUX) OLIVEIRA FILHO, 1977.**

Natal/RN

2014

HUGO WESCLEY BARROS ALMEIDA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PARCIAL E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DO ALGINATO OBTIDO DA ALGA MARROM *LOBOPHORA
VARIEGATA* (LAMOUROUX) OLIVEIRA FILHO, 1977.**

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.

Orientador(a): Prof. Dra. Luciana Guimarães Alves
Filgueira

Natal /RN

2014

HUGO WESCLEY BARROS ALMEIDA

Extração, caracterização estrutural e atividades farmacológicas do alginato obtido da alga marrom *Lobophora variegata* (Lamouroux) Oliveira Filho, 1977.

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.

Aprovado em 26/02/2014.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Luciana Guimarães Alves Figueira
Departamento de Bioquímica – UFRN
Orientadora



Profa. Dra. Celina Maria Pinto Guerra Dore
Centro Universitário Maurício de Nassau – UNINASSAU
1º Examinador



Profa. Dra. Julianna Paiva Viana de Andrade Souza
Departamento de Bioquímica – UFRN
2º Examinador

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Costa, Thiago Gomes.

Caracterização estrutural e avaliação das atividades farmacológicas da fucana B extraída da alga *Dictyota menstrualis* / Thiago Gomes Costa. - Natal, 2014.

105f: il.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Guimarães Alves Filgueira.

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

1. Alga marrom - Dissertação. 2. Atividade antioxidante - Dissertação. 3. Fucanas sulfatadas - Dissertação. I. Filgueira, Luciana Guimarães Alves. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE01

CDU 582.272

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por estar sempre do meu lado e me confortando nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo de todas as decisões tomadas por mim durante a vida acadêmica.

Aos meus irmãos por estarem sempre torcendo por mim.

À minha orientadora Prof^a. Luciana Guimarães Alves Figueira pela orientação e por ter acreditado em mim.

Aos professores do departamento de Bioquímica que contribuíram para minha formação cidadã e acadêmica.

A Prof^a. Edda Lisboa Leite por abrir as portas de seu laboratório e pela contribuição intelectual para esse trabalho.

Aos amigos de longas datas pelo apoio dado durante esse tempo.

Aos amigos de laboratório, pelos ensinamentos diários.

Agradeço Marília, Celina, Almino, Thuane, Luiza, Alisson e Monique por estarem presentes diariamente na minha vida acadêmica.

Ao amigo Thiago Gomes, que se tornou um irmão durante o tempo de graduação e mestrado e que, apesar de ser um porre, tem um coração de ouro.

À Kahena, que sempre esteve ao meu lado batalhando atrás de resultados, virando madrugadas fazendo experimentos e, mesmo com tantos resultados negativos, não faltava um sorriso no rosto.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, pelo companheirismo diário.

À CAPES, CNPq, UFRN/PPg-Bioquímica pelo suporte financeiro e por acreditar no potencial deste estudo.

RESUMO

Os ácidos algínicos ou alginatos são polissacarídeos ácidos presentes em algas marrons amplamente utilizadas na indústria de alimentos, estética, médica e farmacêutica. Este trabalho propõe a extração, caracterização química e verificação das atividades farmacológicas da alga marinha marrom *Lobophora variegata*. O alginato foi extraído da alga *Lobophora variegata* e parte foi sulfatado para fins comparativos. O extrato nativo apresentou 42% de açúcar total, 65% de ácido urônico, 0,36% de proteína e 0% de sulfato, enquanto a sulfatada apresentou 39%, 60%, 0,36% e 27,92% respectivamente. A presença do grupo sulfato pode ser verificada através da metacromasia com o corante azul de toluidina no sistema de eletroforese e vibração característica em $1262,34\text{ cm}^{-1}$ na espectroscopia de infravermelho, atribuído a ligações S=O. Observou-se a formação de filmes e esferas de alginato nativo, onde a solução mais concentrada 6%, resultou em um filme mais espesso e consistente. O alginato nativo apresentou atividade proliferativa nas concentrações (25 e 50 μg), (50 μg) e (100 μg) em linhagem celular 3T3 em 24h, 48h e 72h, respectivamente, já o sulfatado em (100 μg) em 24h. Apresentou também atividade antiproliferativa ou citotóxica em células da linhagem HeLa, com (25 e 100 μg), (25 e 100 μg) e (25, 50 e 100 μg), para o nativo, já para a sulfatada nas concentrações (100 μg) em 24h, (25, 50 e 100 μg) em 48h, e (50 e 100 μg) 72h. Quanto a atividade antioxidante, os alginatos sulfatados apresentam melhor atividade antioxidante total chegando a 29% de atividade enquanto o nativo 7,5% de atividade. Para o radical hidroxila o AS apresentou alta inibição (entre 77-83%) nas concentrações testadas, porém o AN superou estes números na ordem de 78-92% de inibição. O poder redutor de AN e AS variou entre 39-82%. Na metodologia de quelação férrica, o NA chegou a 100% de quelação, enquanto o AS permaneceu em um platô oscilando em 6,5%. Contudo, neste trabalho, pudemos constatar alginatos com promissoras atividades farmacológicas, com uso nas diversas indústrias como um composto antioxidante/antitumoral.

Palavras-chave: Alginato, Alga marrom, Proliferação celular, Antioxidante.

ABSTRACT

The alginic acid or alginates are acidic polysaccharides found in brown seaweed widely used in food, cosmetic, medical and pharmaceutical industry. This paper proposes the extraction, chemical characterization and verification of the pharmacological activities of brown seaweed variegata *Lobophora*. The alginate was extracted from the seaweed *Lobophora variegata* and part was sulphated for comparative purposes. The native extract showed 42% total sugar, 65% uronic acid, 0,36 % protein and 0% of sulfate, while the sulfate showed 39% , 60%, 0.36% and 27,92 % respectively. The presence of a sulfate group may be observed by the metachromasia with toluidine blue in electrophoresis system and characteristic vibration $1262,34\text{ cm}^{-1}$ in infrared spectroscopy connections assigned to S = O. We observed the formation of films and beads of native alginate, where more concentrated solution 6% resulted in a thicker and more consistent film. Native alginate showed proliferative activity at concentrations (25 and 50 mcg), (50 mg) and (100 mg) in 3T3 cell line in 24h, 48h and 72h, respectively , as the sulfated (100 mg) in 24 . Also showed antiproliferative or cytotoxic activity in HeLa cells of strain, (25 and 100 mg), (25 and 100 mg) and (25, 50 and 100 mg), to native, now for the sulfate concentrations (100 mg) in 24 (25, 50 and 100 mg) in 48 hours, and (50 and 100 mg) 72h. For their antioxidant activity, the sulfated alginates have better total antioxidant activity reaching 29 % of the native activity while 7.5 % of activity . For the hydroxyl radical AS showed high inhibition (between 77-83 %) in concentrations, but the AN surpassed these numbers in the order of 78-92 % inhibition. The reducing power of AN and AS ranged between 39-82 % . In the method of ferric chelation NA reached 100 % chelating while the AS remained at a plateau oscillating 6.5%. However, in this study , we found alginates with promising pharmacological activities, to use in various industries as an antioxidant / anti-tumor compound.

Keywords: Alginate, brown seaweed, Cell Proliferation, Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore representativa da nova hipótese organizacional dos Eucariotos nos 6 reinos	19
Figura 2	Estruturas de polissacarídeos típicos de parede celular de algas marrons	21
Figura 3	Características estruturais dos alginatos	23
Figura 4	Via da biossíntese dos alginatos	24
Figura 5	Formação do gel de alginato de cálcio	25
Figura 6	Taxas padronizadas de mortalidade por câncer, doenças crônicas respiratórias/DRC, doenças cardiovasculares/DCV, diabetes mellitus/DM e outras DCNT	30
Figura 7	Representante da alga marinha marrom <i>Lobophora variegata</i>	35
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA dos alginatos Nativo e Sulfatado da alga marinha marrom <i>L. variegata</i>	46
Figura 9	Cromatografia descendente em papel das amostras de alginato nativa e sulfatada	48
Figura 10	Espectro de infravermelho do alginato nativo (A) e sulfatado (B) da alga <i>Lobophora variegata</i>	51
Figura 11	Geis A- Alginato 1%; B- Alginato 2%; C- Alginato 4%; D- Alginato 6% e esferas E- de alginato a 6% extraídos da alga <i>L. variegata</i>	52
Figura 12	Efeito do extrato do alginato nativo e sulfatado na proliferação de fibroblastos (células 3T3).....	53

Figura 13	Efeito do extrato do alginato nativo e do sulfatado na proliferação de células de câncer cervical (células Hela). 54
Figura 14	Atividade antioxidante total dos alginatos nativos e sulfatados da alga <i>Lobophora variegata</i> , <i>in vitro</i> 55
Figura 15	Ensaio varredura dos Radicais Hidroxila..... 56
Figura 16	Poder redutor das diferentes concentrações de AN e AS de <i>L. variegata</i> 57
Figura 17	Atividade quelante do íon ferro das diferentes concentrações de AN e AS de <i>Lobophora variegata</i> ... 58
Figura 18	Taxa de inibição de viabilidade celular do AN e AS em células Hela.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por gênero, exceto pele não melanoma	31
Tabela 2	Propriedades farmacológicas de alginatos.....	32
Tabela 3	Rendimento (%) dos alginatos nativo e sulfatado.....	45
Tabela 4	Composição monossacarídica e razão M/G do AN e AS..	49
Tabela 5	Composição química (%) do AN e AS da alga <i>L. variegata</i>	49
Tabela 6	Comparação dos efeitos antioxidantes do AN e AS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

3t3	células de fibroblastos de camundongos
µg	micrograma
µl	microlitro
AN	Alginato Nativo
AS	Alginato Sulfatado
BHT	Hidroxitolueno butilado (Butylated hydroxytoluene)
CAT	Capacidade antioxidante total
Cm	centrímetros
cm⁻¹	Por cm
CS	Condroitin sulfato
DS	Dermatan sulfato
DCV	doenças cardiovasculares
DM	Diabetes mellitus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	Espécies Reativas do Oxigênio
GAGs	Glicosaminoglicanos
g	grama
h	hora
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HeLa	adenocarcinoma cervical

HS	Heparan sulfato
Kg	quilograma
M	Molar
mg	miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MTT	Brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol)-2,5- difenil tetrazolium
N	Normal
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
Nm	nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO₂	íon nitrito
NO₃	íon nitrato
O⁻²	Ânion superóxido
O₂	Oxigênio molecular
°C	graus centígrados
OH	Radical hidroxila
PBS	Tampão salina fosfato
PDA	Diaminopropanoacetato

pH Potencial Hidrogeniônico

rpm Rotação por minuto

v volume

μM Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Algas marinhas	17
1.2. Algas pardas ou marrons	19
1.3. Polissacarídeos ácidos de algas marinhas marrons	21
1.3.1 Fucanas	21
1.3.2 Alginato de algas marrons	22
1.3.2.1 Aplicabilidade dos alginatos	25
1.4. Espécies reativas de oxigênio	26
1.4.1 Compostos antioxidantes	28
1.5. Atividade antiproliferativas	29
1.6. Atividades farmacológicas de alginatos	32
1.7. Propriedades reológicas	33
2 Objetivos	35
2.1. Objetivo Geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. Materiais	36
3.1. Alga Marinha marrom <i>Lobophora variegata</i>	36
3.2. Linhagens celulares	37
3.2.1 Células HeLa (adenocarcinoma cervical - ATCC CCL-2)	37
3.2.2 Células 3T3	37

3.3	Materiais químicos e aparelhos	37
3.3.1	 Reagentes	37
3.3.2	 Aparelhos	39
4.	Metodologia	40
4.2	Extração do Ácido Algínico	40
4.3	Sulfatação	40
4.4.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E ESTRUTURAL	40
4.4.1.	Eletroforese em gel de agarose	40
4.4.2.	Cromatografia descendente em papel	41
4.2.2.1	Quantificação dos níveis de Ácido manurônico e gulurônico	41
4.4.3	Formação de filmes e esferas	41
4.4.4	Análises químicas	42
4.4.4.1.	Ácidos urônicos	42
4.4.4.2.	Açúcares totais	42
4.4.4.3.	Proteína	42
4.4.4.4	Sulfato	42
4.4.5	Espectroscopia de infravermelho	42
4.5.	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	42
4.5.1.	Ensaio de Proliferação Celular (MTT)	42
4.5.2.	Atividade antioxidante	43
4.5.2.1.	Capacidade antioxidante total (CAT)	43
4.5.2.2.	Inibição do radical hidroxila	44

4.5.2.3 Quelante de ferro	44
4.5.2.4 Teste do poder redutor	45
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
6. RESULTADOS	46
6.1 Rendimento	46
6.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL	46
6.2.1. Eletroforese em gel de agarose	46
6.2.2. Cromatografia descendente em papel	47
6.2.2.1 Quantificação dos níveis de Ácido manurônico e gulurônico	48
6.2.3. Análises físicoquímicas	49
6.2.4. Espectroscopia de infravermelho	49
6.2.5 Formação de filmes e esferas	50
6.3. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	51
6.3.1. Ensaio de Proliferação Celular (MTT)	51
6.3.1.1 Teste utilizando células de fibroblastos (3t3)	51
6.3.1.2 Teste utilizando células de câncer cervical (HeLa)	52
6.3.2. Atividade antioxidante	54
6.3.2.1. Capacidade antioxidante total (CAT)	54
6.3.2.2. Inibição do radical hidroxila	55
6.3.2.3. Teste do poder redutor	55
6.3.2.4. Quelação do íon ferro (Fe ⁺⁺)	56
7 Discussão	58
8 Conclusão	65
Referencias	66

1.1 Algas marinhas

O interesse do homem pelas algas marinhas é muito antigo. O primeiro registro da utilização de algas foi encontrado no herbário chinês em 2.700 a.C. e, desde então, elas tem sido usadas como alimentação, ração e adubo em muitos países do mundo (ARASAKI & ARASAKI, 1983). As utilidades das algas são conhecidas há milênios nos países orientais onde são utilizadas amplamente na alimentação.

As algas marinhas são geralmente consideradas como vegetais inferiores, principalmente por apresentarem uma menor diferenciação celular em relação aos vegetais terrestres, que são considerados superiores. As algas não apresentam sistema vascular, entretanto, suas células podem formar aglomerações na forma de fios ou de lâminas finas (MATIAS, 1999; PÁDUA et al., 2004). Encontram-se distribuídas por diferentes habitats: oceanos, corpos de água doce, solos, rochas, sobre a neve e superfície de vegetais; desde que disponham de luz e umidade suficiente (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

Quanto à importância ecológica as algas, aliadas a um pequeno grupo de angiospermas marinhas, estas constituem os produtores primários que sustentam a vida nos mares e oceanos e, portanto, desempenham um papel ecológico fundamental na manutenção destes ecossistemas, pela produção de oxigênio molecular e consequente formação da camada de ozônio que filtra os raios UV, deletérios para o DNA (KASTING, 1993; ALLÈGRE & SCHNEIDER 1994; DUVE, 1996). Estima-se que o fitoplâncton marinho seja responsável por 40 a 50% da produção primária global (BOLIN et al., 1977). Por outro lado, as algas calcárias são elementos importantes na formação e manutenção dos recifes de coral, ecossistemas com biodiversidade comparável à das florestas tropicais (BROWN & OGDEN, 1993; REAKA-KUDLA, 1997; STENECK & TESTA, 1997). Diversos fatores contribuem para a diminuição da diversidade biológica no ambiente marinho. No caso das algas, destacamos como fatores de pressão nas comunidades naturais, a exploração das espécies de valor econômico, a introdução de espécies exóticas, a poluição, destruição e a fragmentação de hábitat (WALKER & KENDRICK, 1998).

As macroalgas marinhas são um grupo de seres vivos aquáticos e autotróficos que apresentam a clorofila A e B como seu principal pigmento fotossintético, como também a presença de outros pigmentos acessórios, que são características importantes na classificação desse grupo (COSTA, 2010). Um dos critérios de classificação das algas marinhas é o seu tipo de pigmento, onde, destacam-se: as Chlorophyceae (algas verdes) possuem as clorofilas a e b como principais pigmentos; as Rhodophyceae (algas vermelhas) possuem como principal pigmento a fucoeritrina; e as Phaeophyceae (algas pardas), apresentam como principal pigmento o carotenóide fucoxantina (O'SULLIVAN, et al., 2010). As Phaeophyceae se destacam devido à presença de laminaranas (polissacarídeos neutros) como moléculas de reserva e pigmentos como clorofila a, clorofila c e xantofilas, sendo a fucoxantina o pigmento responsável pela cor marrom (O'SULLIVAN et al., 2010). Em suas paredes celulares possuem polissacarídeos aniônicos ricos em grupos carboxilas denominados de ácidos algínicos e na matriz extracelular as fucanas (KLOAREG & QUATRANO, 1986).

De acordo com a classificação atual os eucariotos podem ser divididos em seis grupos principais: Opisthokonta, Amoebozoa, Plantae, Chromalveolata, Rhizaria e Excavata (SIMPSON & ROGER, 2004) (Figura1). E nessa divisão as algas verdes estão classificadas, assim como as vermelhas no reino Plantae, já as marrons aparecem no reino Chromaveolata, filo Stramenopiles, mostrando assim uma maior diferenciação com as plantas do que as citadas anteriormente (ROGER & SIMPSON, 2009).

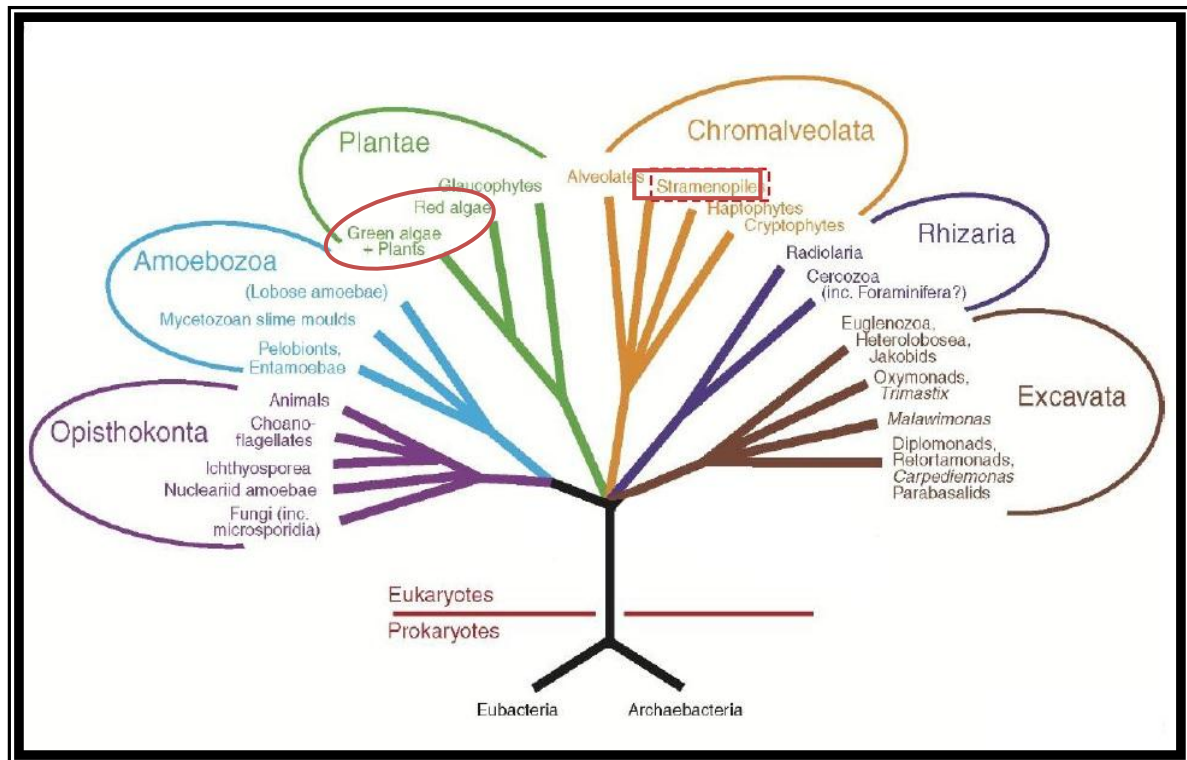


Figura 1: Árvore representativa da nova hipótese organizacional dos Eucariotos nos 6 reinos. Em destaque as algas, na circunferência as verdes e vermelhas, pertencentes do reino Plantae, e no retângulo o filo Stramenopiles, ao qual pertencem as algas marrons ou pardas. (SIMPSON & ROGER, 2004)

1.2 Algas pardas ou marrons

As algas marrons (Divisão Phaeophyta / Classe Phaeophyceae) são um grupo de algas multicelulares, quase exclusivamente marinhas, já que alguns gêneros são de água doce. Em seu habitat, encontram-se fixas às rochas por meio de rizóides e ventosas, e realizam a seleção dos sais presentes na água do mar concentrando ou diluindo alguns deles em relação ao meio circundante. Em águas claras, elas ocorrem desde o nível da maré baixa até a profundidade de 20 a 30 metros (SCHULTZ, 1980, VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004; RAVEN et al., 2007).

Sua coloração marrom se dá devido ao pigmento fucoxantina que é característico do filo. Suas células contêm numerosos plastídeos discóides marrom-dourados, que são similares aos das crisofíceas e diatomáceas, com as quais têm provavelmente uma origem em comum. Além desse pigmento, também apresentam clorofilas a e c,

carotenóides e xantofilas, que dão a elas uma cor mais escura. E, como já dito anteriormente, possuem uma rica fonte de polissacarídeos de reserva, a laminarina, a qual fica armazenada nos vacúolos (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004; RAVEN et al., 2007).

A parede celular de algas marrons tem um compartimento fibrilar formado principalmente de microfibrilas de celulose, a qual é embebida em uma matriz amorfa de polissacarídeos ácidos ligados uns aos outros por proteínas (KLOAREG; QUATRANO, 1998). Segundo Evans & Holligan, (1971), que analisaram partes componentes da alga marrom do gênero *Dictyota*, através de microscopia eletrônica, na cutícula e nos vacúolos de células medulares do talo das algas marrons, junto com a celulose encontra-se o ácido algínico, um dos maiores componentes da parede celular dessas algas o que garante rigidez ao tecido algal.

Além do ácido algínico, diferentes tipos de fucanas (polissacarídeos sulfatados) também são encontradas formando uma matriz mucilaginosa que está relacionada à proteção contra desidratação em períodos de maré baixa, maior flexibilidade à alga permitindo que esta permaneça estendida e assim capte luz e nutrientes (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

A figura 2 mostra a presença dos polissacarídeos carboxilados (ácido algínico) e sulfatados (fucanas), bem como a composição da estrutura da parede celular das algas marrons.

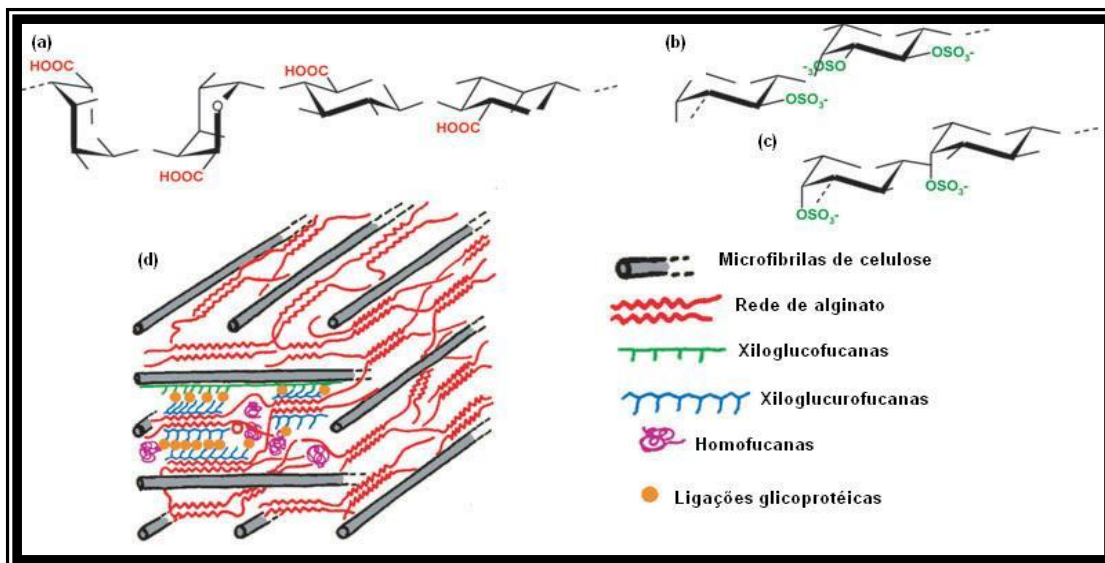


Figura 2: Estruturas de polissacarídeos típicos de parede celular de algas marrons: (a) Alginato; (b) Fucanas de Fucalés; (c) Fucanas de Ectocarpales. (d) Modelo hipotético da organização bioquímica das paredes celulares de algas marrons. (MICHEL et al., 2010, adaptada de KLOAREG et. al., 1986).

1.3 Polissacarídeos ácidos de algas marinhas marrons

Os polissacarídeos ácidos encontrados em algas marinhas marrons são: fucanas e ácido algínico. A estrutura química, propriedades físico-químicas e atividades biológicas desses açúcares têm sido amplamente estudadas (ANDRADE et al., 2004; BANDYOPADHYAY e col., 2011; LEAL, et al., 2008; KIM, & WIKESEKARA, 2010; COSTA, 2010; MARQUES, et al., 2007; FENORADOSOA et al., 2010; ZHAO et al., 2012), com o intuito de se obter novas fontes de compostos bioativos naturais.

1.3.1 Fucanas

As fucanas de algas são polissacarídeos sulfatados encontrados na matriz de feofíceas e equinodermas que apresentam um caráter altamente higroscópico. Tais compostos possuem como principal característica estrutural a presença de α -L-fucose e grupos sulfato (ROCHA, 2004), contendo também proporções de outros açúcares como: manose, xilose, galactose e ácidos urônicos (KLOAREG et al., 1986; DIETRICH et al., 1995; LEITE, et al., 1998; PEREIRA et al., 1999; CARDOSO et al., 2010).

As fucanas de algas marrons foram inicialmente isoladas por Kylin (1913, 1915), porém somente com os estudos feitos por Bird e Haas (1931) foi demonstrada a

presença de grupos sulfatados nos monômeros de fucose. Estes são compostos bioativos geralmente ramificados, heterogêneos, pelo conteúdo adicional dos constituintes monossacarídicos e grupamento acetil, com peso molecular variado apresentando um padrão de sulfatação não regular. Apesar de todas as características conhecidas sobre as fucanas de algas, a estrutura química destes compostos continua a ser alvo de estudos, visto que cada fucana extraída apresenta estrutura diferente (NAGUNO, NISHIMO, 1996; BILAN et al., 2002). Este fato é consequência da variabilidade estrutural apresentada por estes compostos conforme mostraram estudos realizados com fucanas extraídas de diversas ordens de feofíceas (DIETRICH et., 1995; LEITE et al., 1998; ROCHA, 2005; RUPÉREZ, et al, 2002; DORE et al., 2013; CASTRO et al., 2013).

A estrutura desses polímeros pode variar de acordo com a espécie de alga como também em diferentes partes da mesma alga (DIETRICH et al., 1995) logo, cada nova fucana extraída e purificada é um composto estruturalmente único e, conseqüentemente, pode apresentar um potencial farmacológico e biotecnológico único.

1.3.2 Alginato de algas marrons

O alginato é um heteropolissacarídeo encontrado tanto em bactérias como também na matriz extracelular de algas marrons, chegando a render cerca de 40-60% do peso seco do vegetal. Foi descoberto em algas marrons no final do século 19 e desde a sua descoberta tornou-se um importante produto industrial, utilizado em alimentos, materiais estéticos e indústria médica e farmacêutica (HAY et al., 2010).

Sua estrutura caracteriza-se por ser um polissacarídeo não sulfatado, linear, compostos de resíduos de ácido β -D-manurônico (bloco M) unidos por ligações do tipo (1 \rightarrow 4) e resíduos de seu epímero, o ácido α -L-gulurônico (bloco G) em várias proporções. Estes resíduos são agrupados na forma de blocos de ácido gulurônico (G) ou ácido manurônico (M) que podem ser compostos por blocos homopoliméricos (GG e MM) junto com blocos alternados (MG) na mesma molécula (DRAGET, 2005), (Figura 3).

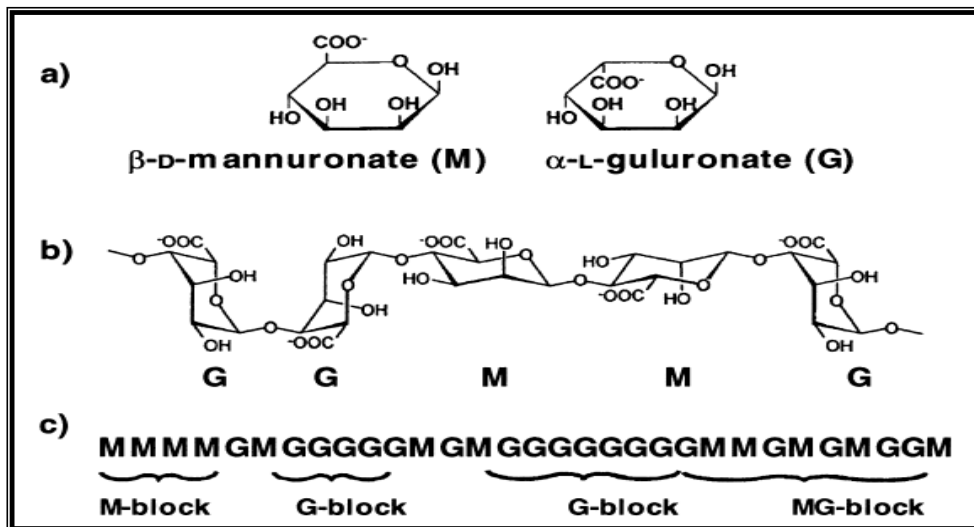


Figura 3: Características estruturais dos alginatos. a) monossacarídeos dos alginatos, b) conformação da cadeia e c) distribuição dos blocos (DRAGET, 2005).

A composição e o arranjo de seus resíduos dependem da atividade de determinadas enzimas. A incorporação de carbono nos alginatos e o estudo de seus nucleotídeos precursores de açúcares foi revisada por Gacesa (1992). A variação dos blocos M e G pode ser explicada com o entendimento da via biossintética do ácido algínico, através da especificidade de várias enzimas que atuam nesta via (LIN & HASSID, 1966a), bem como, pelo isolamento dos nucleotídeos envolvidos no metabolismo dos açúcares (LIN & HASSID, 1966b). Posteriormente, vias semelhantes foram descritas para bactérias produtoras de ácido algínico, como a *Azobacter vinelandi* (PINDAR & BUCKE, 1975) (figura 4) e *Pseudomonas aeruginosa* (BANERJI e col, 1983; BUENO, W.M; GARCIA-CRUZ et al., 2006).

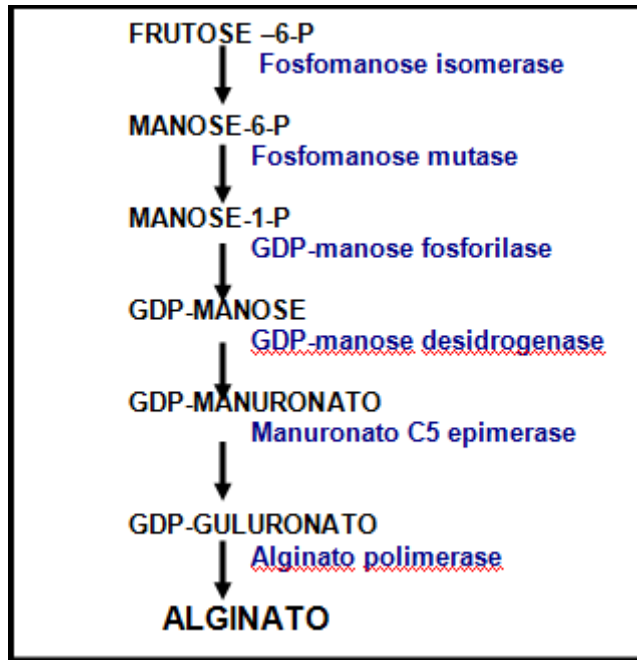


Figura 4: Via da biossíntese dos alginatos. Fonte: Moe et al., 1995.

Quanto à viscosidade, dados de soluções de alginatos revelam que a rigidez dos blocos da cadeia aumenta na seguinte ordem $MG < MM < GG$. O grupo carboxílico é responsável por uma ligação glicosídica: diequatorial (MM), diaxial (GG), equatorial-axial (MG), e axial-equatorial (GM), (NUSSINOVITCH, A., 1997).

As diferenças da relação M/G da configuração em blocos explica as diferenças das propriedades e funcionalidades do alginato, em especial a capacidade gelificante e a força do gel, enquanto a proporção dos blocos está diretamente relacionada à variação sazonal, (DRAGET, 2005.) Os íons divalentes estabelecem ligações iônicas com as carboxilas presentes nos blocos G (homopolímeros G-G-G) e nos blocos alternados MG (MG-MG ou MG-GG) levando a formação de estruturas chamadas “caixas de ovos” (DONATI et al., 2005) (figura 5).

A variação da viscosidade pode ser explicada pela forma de complexação dos cátions com os blocos de alginato, que são estruturas polianiônicas (COO^-). As cadeias G, de acordo com o arranjo espacial podem quelar os íons metálicos nas suas estruturas tipo “caixas de ovos” explicando, assim, a alta afinidade desses polímeros pelo íon cálcio (GRANT e col., 1973).

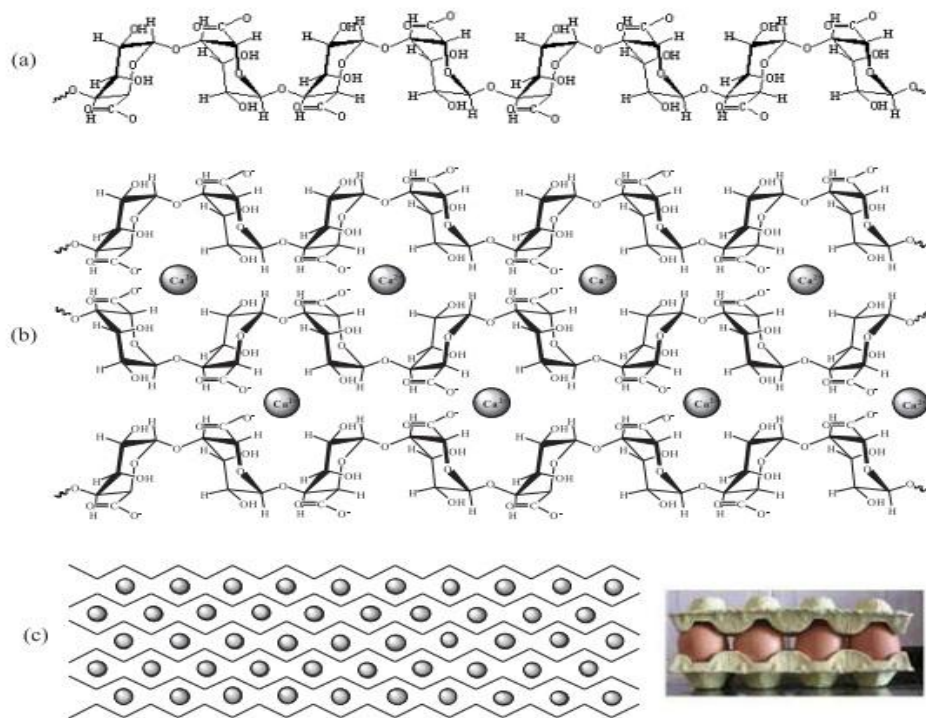


Figura 5: Formação do gel de alginato de cálcio. (a) homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução; (b) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através dos íons cálcio dando a conformação de caixa de ovo. (KAWAGUTI, H. Y. & SATO, H. H., 2008) adaptado.

Apesar do alginato comercializado ainda hoje, ser extraído principalmente a partir de algas marrons, existe a capacidade de se modificar geneticamente alguns gêneros de bactérias produtoras de ácido algínicos, como é o caso dos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas*, para a produção de alginatos específicos (REHM, 2010).

1.3.2.1 Aplicabilidade dos alginatos

O alginato é amplamente utilizado em alimentos, cosméticos, medicamentos e também encontra aplicação na indústria têxtil e de papel. Atualmente vem sendo utilizado em aplicações inovadoras na área médica e farmacêutica (DRAGET & TAYLOR, 2009; ADNEN SANAA et al. 2013; CHAN & MOONEY, 2013, ALBOOFETILEH et al., 2014; WANG et al., 2014).

Aplicações industriais mais desenvolvidas consistem no emprego como agente espessante e emulsificante em indústrias alimentícias, enquanto outras aplicações

biotecnológicas potenciais vêm despontando, como por exemplo na liberação controlada de drogas (GEORGE & ABRAHAN, 2006; QI et al., 2006).

Suas principais propriedades e usos estão baseadas na formação de solução viscosa em baixas concentrações. Seu comportamento com polieletrólitos e a facilidade com que formam géis por interações com íons de cálcio produz alginatos com diferentes propriedades reológicas (MACDOWELL, 1975). É comum a sua utilização como estabilizante em alimentos resultando da combinação de suas duas propriedades: polieletrólito e alta viscosidade. A formação de géis é ainda hoje utilizada na impressão de material dentário. O alginato ou hidrocolóide irreversível é um dos materiais de moldagem mais aceitos e utilizados na odontologia. Muitas substâncias como zinco, cádmio, silicato de chumbo e fluoretos foram adicionadas em algumas marcas de alginatos com o objetivo de melhorar suas propriedades físicas, químicas e mecânicas (PHITON et al., 2010). Sorvetes foram um dos primeiros produtos onde o alginato de sódio teve aplicação na indústria de alimentos com a finalidade de reduzir a formação de cristais de gelo e produzir uma textura lisa e macia (MCHUGH, 1987). Preparados de frutas para iogurtes, bebidas lácteas e recheios é outra aplicação muito conhecida (OLIVEIRA FILHO & QUÉJE, 1978).

1.4 Espécies reativas do oxigênio

Radical livre é uma espécie química que possui um ou mais elétrons desemparelhados, no qual este elétron desemparelhado está sozinho em um orbital. Estes desemparelhamentos de elétrons conferem alta reatividade a estes compostos, fazendo com que reajam nos locais onde foram formados (WICKENS, 2001). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são metabólitos fisiológicos formados durante o metabolismo celular aeróbico (FERREIRA & MATSUBARA, 1997), para geração de ATP na cadeia transportadora de elétrons localizada na membrana mitocondrial interna (MURAVHICK, LEVY, 2006). As ROS são frequentemente utilizados para radicais livres (OH^\cdot , O_2^\cdot) e não radicais livres (H_2O_2) (ARUOMA, 1998).

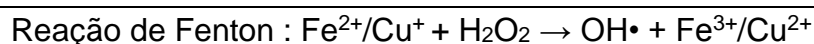
Uma vez formado estes podem interagir com outros radicais ou com outras moléculas. Ao reagir com o DNA modificam as bases que compõem esta molécula e caso não haja um reparo correto pode levar a mutações ou inativar genes importantes.

Quando reagem com proteínas, as espécies reativas de oxigênio (ROS), são capazes de oxidar grupos sulfidrilas (-SH) à pontes dissulfeto (S-S), alterando sua conformação e por fim a função destes componentes. Podem ainda iniciar a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados que constituem os lipídios das membranas celulares (peroxidação lipídica) levando a mudanças estruturais e funcionais em suas estruturas.

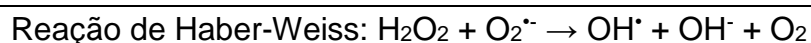
Diante disto, a elevação da produção de ROS pode conduzir a doenças, tais como: alguns tipos de câncer (VALKO et al., 2006), artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, algumas desordens neurológicas assim como também o envelhecimento e aterosclerose (KOVATCHEVA et al., 2001; RUBERTO et al., 2001) e diabetes tipo 2 (KANETO et al., 2010).

O radical hidroxila (OH•) é o mais reativo dentre os radicais livres (DROGE, 2002). A combinação extremamente rápida do OH• com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o OH• for produzido próximo ao DNA e a este estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o OH• pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).

O radical hidroxila pode ser formado quando o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) reage com íons ferro ou cobre. A reação é conhecida como Reação de Fenton.



Os íons de metais de transição podem também catalisar a reação entre H₂O₂ e o superóxido (O₂^{•-}), conduzindo à produção de OH•, a chamada Reação de Haber-Weiss.



O ferro e o cobre são transportados, utilizados e estocados ligados a proteínas específicas (transferrina, ferritina e ceruloplasmina), as quais previnem ou minimizam

as reações de oxidação catalisadas por estes minerais. Os íons ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução, (WELCH, 2002)

1.4.1 Compostos antioxidantes

Com a alta reatividade das espécies reativas do oxigênio no corpo humano estes são balanceados pela ação de antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos, retardando ou prevenindo a oxidação de substratos celulares oxidáveis, promovendo a inibição da geração ou sequestro das espécies reativas de oxigênio. Os antioxidantes enzimáticos mais eficientes compreendem as enzimas: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Entre as defesas não enzimáticas estão: ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenóides, antioxidantes tióis (glutathione, tioredoxina, e ácido lipóico), ácido úrico, ubiquinol, melatonina e os polifenóis (LAGUERRE et al., 2007, VALKO et al., 2007; FERREIRA & MATSUBARA, 1997). As propriedades antioxidantes naturais encontradas em algumas frutas, ervas e condimentos estão relacionadas também com a presença de compostos fenólicos (LEJA et al., 2007).

Alguns agentes antioxidantes sintéticos como o BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado), o tert-butilhidroxiquinona (TBHQ) e o galato propil (PG) são muito utilizados em alimentos processados, no entanto há uma preocupação na utilização desses antioxidantes visto que o BHA e o BHT são suspeitos de causar danos ao fígado e promover carcinogênese (ITO, et al, 1985; QI et al., 2005 a,).

Em seu habitat natural, as algas marinhas, estão sujeitas a repetidos ciclos de imersão/emersão devido às flutuações da maré, exposição direta a radiação ultravioleta, mudanças bruscas de temperatura, estresse osmótico, dessecação e diferentes concentrações de oxigênio, causando estresse. No entanto, as algas não sofrem dano oxidativos severos, o que sugere a presença de componentes/mecanismos protetores mediados por enzimas e/ou compostos antioxidantes não enzimáticos (AGUILERA et al., 2002; CARDOZO et al., 2007; ROCHA et al., 2007; MATSUKAWA et al., 1997).

Devido aos danos que podem ser causados ao organismo pelos ROS e também o efeito deletério de alguns antioxidantes sintéticos, as pesquisas em torno de novos

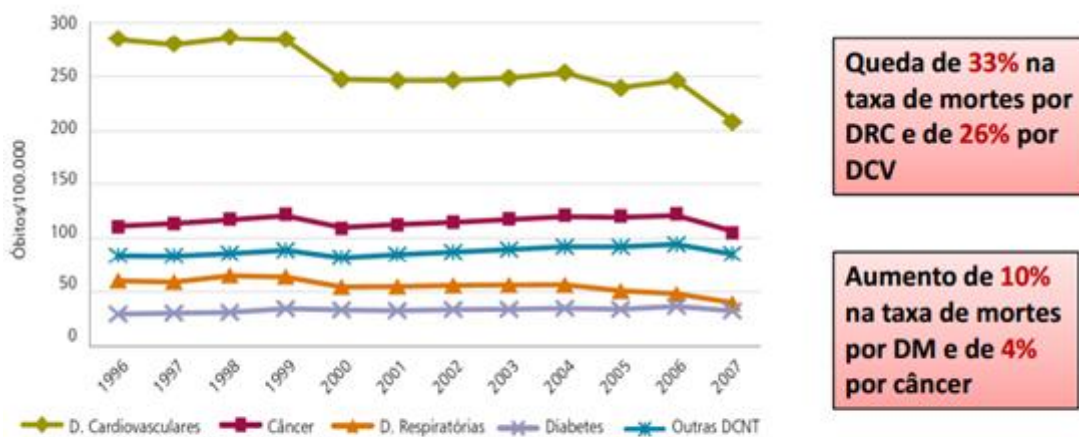
compostos antioxidantes, principalmente os naturais, vem aumentando (WENG & WANG 2000). Dentre os quais estão: alginatos e fucanas (SPIZZIRRI G. U., & col. 2010; LI et al., 2008, COSTA et al., 2010; CASTRO et al., 2013; ZHAO et al., 2013), chá de erva mate (CARDOZO-JUNIOR et al., 2007), dentre outros.

1.5 Atividade antiproliferativa

O câncer é uma doença que ocorre quando há uma grande alteração nos sistemas que regulam a proliferação e diferenciação celular. A origem desta doença é consequência de alterações gênicas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes, inativação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos, os chamados carcinógenos (SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003).

Uma vez acometida esta alteração genética, ocorre uma proliferação anormal de uma única célula, seguida pelo supercrescimento de uma população derivada desta célula e mutações adicionais com seleção clonal, ou seja, seleção de descendentes com vantagens como crescimento mais rápido, maior sobrevivência celular ou outras propriedades (COOPER, 2001; DEVLIN, 2007; RANG *et al.*, 2004).

O câncer hoje é um grande problema de saúde público a nível mundial, cuja incidência aumenta anualmente. No Brasil o câncer constitui a segunda causa de morte por doenças (Figura 6) e os dados para o ano de 2012, também válidos para o ano de 2013, indicaram a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer no país (Tabela 1). Desse modo, os tipos mais incidentes são os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto e de estômago para o sexo masculino e os cânceres de mama, colo do útero, cólon e reto e da glândula tireóide para o sexo feminino (INCA, 2012).



Fonte: SIM-CGIAE/Dasis/SVS/MS
Taxa Padronizadas pela distribuição etária internacional (AHMAD, 2001)

Figura 6: Taxas padronizadas de mortalidade por câncer, doenças crônicas respiratórias/DRC, doenças cardiovasculares/DCV, diabetes mellitus/DM e outras DCNT (por 100mil hab.) – Brasil, 1995 a 2007. Fonte: Brasil. Ministério da saúde. Plano nacional de saúde (PNS). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/SAUDE_BRASIL_2009_COLETIVA.pdf [Acesso em 1 de fevereiro de 2013].

Tabela 1

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por gênero, exceto pele não melanoma*

Localização primária	casos novos	Percentual		Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens Mulheres 	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%		Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon Reto	14.180	7,3%		Cólon Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%		Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%		Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%		Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%		Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%		Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%		Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%

Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 1 de fevereiro de 2013]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>

A atividade antiproliferativa é considerada um parâmetro para a detecção da atividade antitumoral (RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004). Existem varias metodologias para os ensaios dessas atividades: contagem celular, clonogênicos, medidas de incorporação de nucleotídeos radioativos ou métodos colorimétricos (HENRIKSSON *et al.*, 2006). Na maioria dos testes colorimétricos, a taxa do crescimento e multiplicação é medida indiretamente por indicadores de crescimento pelo aparecimento de coloração, cuja intensidade é diretamente proporcional ao número de células viáveis (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Frente a estes dados busca-se a descoberta de compostos com atividade antitumoral já que estudos como o de Brandão *et al.*, 2010, mostram que compostos de origem vegetal podem atuar diretamente ou indiretamente no DNA das células por inibição de funções metabólicas do DNA auxiliando no combate dessas mutações.

1.6 Atividades farmacológicas de alginatos

Atualmente, indústrias farmacêuticas e biomédicas têm apresentado muito interesse no uso do alginato (SHILPA; AGRAWAL; RAY, 2003). Uma de suas propriedades bem exploradas é a sua capacidade de agir como espessante, geleificante e agente coloidal (LIEW *et al.*, 2006). Como apresenta propriedades não imunogênicas (GOMBOTZ; WEE, 1998), de biocompatibilidade (EISELT *et al.*, 2000), bioadesão (PEPPAS; BURI, 1985) e de baixa toxicidade (SMIDSROD; SKJAK-Br, 1990), pode ser muito utilizado em indústrias de biotecnologia.

Dentre as atividades farmacêuticas observa-se propriedades antitumorais de alginatos administrados oralmente, em ratos transplantados com sarcoma 180 (SOUZA, *et al.*, 2007), atividade antiviral com alginatos ricos em ácido gulurônico e seus derivados quimicamente sulfatados apresentado atividade contra o vírus da herpes (HSV-1) e com ausência de citotoxicidade (SINHA *et al.*, 2010; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2011), atividade antioxidante (SPIZZIRRI *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2013), anti-agregante plaquetário (KHODAGHOLI *et al.*, 2008; REZAI & KHODAGHOLI, 2009), efeitos anti-inflamatórios (MO *et al.*, 2003) e aumento da proteção contra a infecção por alguns patógenos (AN *et al.*, 2009) dentro outros (Tabela 2).

Estruturas constituídas somente de grupos gulurônicos foram propostas para o tratamento de pacientes portadores de fibrose cística em função de sua capacidade de modificar as características reológicas do muco (DRAGET; TAYLOR, 2009). Novas possibilidades de aplicação de alginatos de alta qualidade envolvem sua utilização no transplante de células. Entre os estudos apresentados na literatura é reportada sua utilização para imobilizar células produtoras de insulina para reversão de diabetes tipo I e para elaborar cápsulas de alginato/poli-L-lisina contendo Ilhotas de Langerhans, que são avaliadas atualmente como pâncreas endócrino bioartificial (SABRA et al, 2001; DRAGET & TAYLOR, 2009).

Tabela 2 – Propriedades farmacológicas de alginatos.

ATIVIDADE	REFERÊNCIA
ANTITUMORAL	SOUZA, et. al., 2007 FUJIHARA & NAGUMO, 1992; 1993
ANTIVIRAL	SINHA et al., 2010 BANDYOPADHYAY et al, 2011
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	SO et al., 2007 SPIZZIRRI et al., 2010 ZHAO et al., 2012 PARWANI et al., 2013
ANTI-AGREGANTE PLAQUETÁRIO	KHODAGHOLI et al., 2008 REZAI & KHODAGHOLI, 2009
ANTI-INFLAMATÓRIO	MO et al., 2003 ZHAO et al., 2007
ANTICOAGULANTE	ZHAO et al., 2007 FAN et al., 2010
LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS	GOMBOTZ et al., 1998 SABRA et al, 2001 HERMES et al., 2002 DRAGET & TAYLOR, 2009
PROTEÇÃO CONTRA A INFECÇÃO POR PATÓGENOS	AN et al., 2009
IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS	SMIDSRÖD et al., 1990 STABLER et al., 2001

1.7 PROPRIEDADES REOLÓGICAS

A reologia é uma ciência que descreve as propriedades mecânicas dos vários materiais, sob várias condições de deformação reversíveis (NAVARRO, 1997), envolvendo elasticidade, a viscosidade e a plasticidade. Os materiais podem ser: sólidos ideais, os quais se deformam elasticamente; fluidos ideais, líquidos e gases que se deformam irreversivelmente. A grande parte dos líquidos apresentam comportamento reológico que classifica entre sólidos e líquidos, ou seja, são elásticos e viscosos, portanto chamados de viscoelásticos (SCHRAMM, 2006).

A viscosidade é uma grandeza que mede o atrito entre as camadas consecutivas de líquido, e a resistência ou fricção interna de um fluido a qualquer mudança do seu volume, sendo função da resistência chamada de cisalhamento, na qual, é a força necessária para causar o movimento das camadas, que ocorre quando um fluido se move fisicamente ou é distribuído. Logo os fluidos viscosos necessitam de mais força para se mover em relação aos menos viscosos, (MILAS & RINAUDO, 1991; SCHOTT, 1992; BERRIAUD et al., 1994).

A viscosidade é dependente de alguns parâmetros como a natureza físico-química de uma substância tais como: temperatura onde geralmente a viscosidade diminui com seu aumento, a pressão geralmente o seu aumento também eleva a viscosidade, a taxa de cisalhamento pode elevar ou diminuir a viscosidade dependendo também do tempo do cisalhamento.

Os fluidos podem ser classificados como fluidos newtonianos e não-newtonianos. Os fluidos os quais a viscosidade não é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento são classificados como newtonianos, já todos os outros fluidos que não apresentam esse comportamento são classificados como não-newtonianos. Para os polissacarídeos diluídos o comportamento do fluido é de um fluido newtoniano (WALTER, 1998).

Com esse estudo, é possível compreender os fenômenos que ocorrem com polímeros em solução uma vez que os alginatos tem ampla aplicação na indústria biotecnológica e farmacológica (LIEW et al. 2006, DRAGET & TAYLOR, 2009) com a formação de géis e esferas.

Por ser considerado como um polímero não-tóxico, não imunogênico e biodegradável o alginato vem sendo um forte candidato para aplicações biomédicas (KUMAR, 2000). Soma-se a isto, o fato de que o litoral norte-rio-grandense possui uma extensa biomassa de algas pardas, muitas das quais ainda não foram objeto de estudo para extração, caracterização estrutural e atividades farmacológicas destes compostos.

Diante disto, o presente trabalho combina uma metodologia de extração de baixo custo para exploração de novas moléculas de alginatos, que originam compostos parcialmente ou totalmente livres de contaminantes (como lipídeos e proteínas), com a investigação de atividades farmacológicas que possam ser desempenhadas por estes compostos nativos e seu derivado sulfatado quimicamente.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Extrair, caracterizar parcialmente, modificar a estrutura e analisar possíveis atividades farmacológicas de alginatos nativos e modificados, obtidos da alga marinha *Lobophora variegata*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os alginatos;
- Sulfatar parte dos alginatos obtidos;
- Determinar a composição química dos alginatos nativos e sulfatados;
- Caracterizar estruturalmente os alginatos nativos e sulfatados por Espectroscopia de Infravermelho;
- Avaliar a atividade antiproliferativa dos alginatos nativos e sulfatados, frente as linhagens celulares de adenocarcinoma cervical – HeLa (ATCC CCL-2) (modificada) e fibroblastos de camundongos (3T3)(normal);
- Avaliar possíveis mecanismos de ação antioxidante dos alginatos nativos e sulfatados;

3. MATERIAIS

3.1. Alga Marinha marrom *Lobophora variegata*

O objeto desse estudo foi extraído da alga marrom *Lobophora variegata* (*L. variegata*) (Figura 7) coletada na praia de Búzios, litoral do Rio Grande do Norte, e identificada pela Dra. Eliane M. Soriano (Departamento de Oceanografia e Limnologia, UFRN).

A coleta foi realizada em Maio de 2010, em marés baixas entre 0,0 - 0,1m a uma temperatura entre 27-32 °C. Após a coleta, a alga foi acondicionada em sacos de polietileno e levada ao Laboratório de Glicobiologia Vegetal localizado na Universidade Federal do Rio Grande do norte, para que fossem devidamente lavadas em água corrente e limpas de epífitas, inclusões calcárias, sais e demais resíduos. Posteriormente, foram colocadas em uma estufa aerada a uma temperatura de 45°C para serem secas e por fim trituradas, pesadas e acondicionadas em frascos de vidro hermeticamente fechados.



Classificação taxonomica:
Divisão:
Phaeophyta
Classe:
Phaeophyceae
Família:
Dictyotaceae
Gênero:
Lobophora
Espécie:
Lobophora variegata

Figura 7: Representante da alga marinha marrom *Lobophora vaiegata*

3.2 Linhagens celulares

3.2.1 Células HeLa (adenocarcinoma cervical - ATCC CCL-2)

A linhagem celular utilizada no presente estudo foi gentilmente cedida pela professora Dra. Silvia Regina do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e utilizada nas dependências da Sala de Cultura do Departamento de Bioquímica desta mesma universidade.

3.2.2 Células 3T3

As células de fibroblastos de camundongos (3T3) utilizada no presente estudo foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Edvaldo S. Trindade do departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e utilizadas nas dependências da Sala de Cultura do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

3.3 Materiais químicos e aparelhos

3.3.1 Reagentes

- 1,10-Fenantrolina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Acetona (Cromato produtos químicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Ácido 2-tiobarbitúrico 98% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Ácido acético (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Ácido ascórbico 99% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Ácido clorídrico (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Ácido sulfúrico (Cromato produtos químicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Ácido tricloroacético (TCA) (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Agarose (Standard-Low-Mr) da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
- Azul de toluidina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Bacto-gelatin (Difco Laboratories Inc, Detroit, MI, USA);
- BHT (Farmafórmula, Natal, Brasil);
- Butanol (Cromato produtos químicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Carbonato de sódio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Cloreto férrico (Cromato produtos químicos Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Condroitim sulfato - Seikagaku Kogyo Co. (Tóquio, Japão);
- Coomassie Blue Brilliant G (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);

- Dermatam sulfato - Seikagaku Kogyo Co. (Tóquio, Japão);
- Etanol (Cromoline, SP, Brasil);
- Fenol (Nuclear, SP, Brasil);
- Ferricianeto de potássio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Ferrozina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Fosfato de sódio monobásico (Nuclear, SP, Brasil);
- Heparum sulfato (purificado de pulmão bovino no INFAR, UNIFESP (São Paulo, SP));
- MTT – brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA);
- Peróxido de hidrogênio (Cromato produtos químicos, SP, Brasil);
- Piridina (MERK, Darmstadt, Germany);
- Sulfato de ferro II - sulfato ferroso - (Cromoline Química Fina Ltda, Diadema, SP, Brasil);
- Sulfato ferroso (Cromoline, SP, Brasil);
- Tampão 1,3 diaminopropanoacetato (PDA);

3.3.2 Aparelhos

Além dos usais de laboratório podemos destacar:

- Agitador de tubos mod AP 56 da Phoenix Ltda. (Araraquara, SP, Brasil);
- Agitador orbital mod. 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Banhos e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Bombas peristálticas Microperpex S mod. 2232 da LKB (Bromma, Suécia) e Econo Pump mod. EP-1 da Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA).

- Centrífuga refrigerada RC 2-B da Ivan Sorvall Inc. (Norwalk, CO, EUA).
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltd. (Tóquio, Japão).
- Espectrofotômetros Varian - Series 634 da Varian Techtron PPTY Ltd. (Springvale, Vico, Austrália) e Hitachi U-2000 (Tóquio, Japão).
- Espectrômetro de infravermelho modelo FT1 6PC da Perkin Elmer (EUA)
- Evaporador rotatório Evapo-Mix da Buchler Instruments (Fort Lee, NJ, EUA).
- Medidor de pH, Orion Research model 701 A/ digital Ionalyzer (Cambridge, MA, EUA)
- Fontes de corrente contínua regulável desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica Permatron Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

4. METODOLOGIA

4.1 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO ALGÍNICO

A alga seca foi submetida ao processo de lavagem e limpeza. Em seguida, foi tratada com dois volumes de acetona, sob agitação, durante 12 horas, para uma parcial despigmentação e delipidação do material. Passado o tempo, a acetona foi então decantada e o resíduo posto para secar a 45°C, sob aeração, aferindo-se novamente o peso seco do material, que se convencionou chamar de pó cetônico.

A extração do ácido algínico foi feita segundo metodologia descrita por Durairatnan & Nascimento (1984). O precipitado resultante foi solubilizado em carbonato de sódio (uma vez que alginatos de cálcio são insolúveis em água), obtendo-se assim alginatos de sódio, os quais foram submetidos a tratamento com dois volumes de metanol absoluto, para a remoção de contaminantes e precipitação dos alginatos, liberando o alginato de sódio parcialmente purificado (Figura 8).

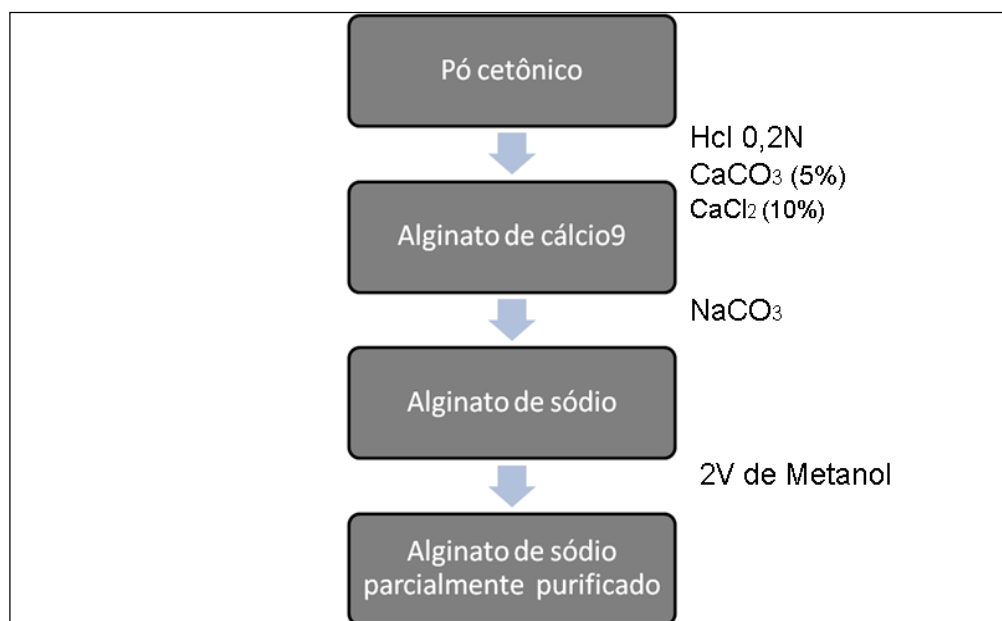


Figura 8 - Metodologia extração do ácido algínico descrita por CAMERON e col. (1948).

4.2 SULFATAÇÃO

A sulfatação dos alginatos foi desenvolvida de acordo com o método de Wang (2005). Foi adicionado 12,5mL de H₂SO₄/g de amostra e a mistura mantida sob leve agitação em presença de 12,5mL de n-propanol a -6°C por 90 min. O sedimento foi coletado por centrifugação (10.000 rpm , 20 min., -10°C) e lavado três vezes com 15mL de n-propanol sob centrifugação. O precipitado foi recolhido, solubilizado em água destilada e novamente centrifugado para descarte dos polissacarídeos que não foram sulfatados.

4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E ESTRUTURAL

4.3.1. Eletroforese em gel de agarose

A agarose (0,6%) foi diluída em tampão 1,3 diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 e foi colocada sobre lâminas de vidro medindo (7,5x 5,0x 0,2cm) e (7,5x 10x 0,2cm) até o resfriamento e formação do gel. Alíquotas de 5 µL (50 µg das amostras) foram aplicadas em canaletas no gel e submetidas à eletroforese (5 V/cm durante aproximadamente 1 hora), em uma cuba resfriada a 4°C. A origem das aplicações corresponde ao pólo negativo, (DIETRICH & DIETRICH, 1977). Após o tempo previsto de migração eletroforética para o sistema de tampão PDA, os compostos foram precipitados no gel de agarose pela submersão do gel por um tempo mínimo de duas horas, a temperatura ambiente, em CETAVLON 0,1% (brometo de N-cetil-N-N-N-trimetilamônio). Após a precipitação da amostra, o gel foi seco sob uma corrente contínua de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1 %, numa solução de ácido acético 1% e etanol 50% para a verificação da sulfatação do alginatos, o excesso de corante foi removido em solução descorante, uma solução preparada a partir de ácido acético 1% em etanol 50 %. A etapa de descoloração do gel de agarose é repetida até que o fundo da lâmina descora-se completamente. Em seguida, é feita uma segunda descoloração descrita por Newton et.al. (1974), onde a lâmina é imersa em uma solução composta por ácido acético 0,2M e tampão acetato de sódio 0,2M, durante 30 minutos e depois é colocada novamente no corante azul de toluidina, para a verificação dos compostos carboxilados, os alginatos. Em seguida, o gel foi seco novamente à temperatura ambiente.

4.3.2. Cromatografia descendente em papel

A cromatografia dos produtos de hidrólise (HCl 4N, 2 h., 100°C) dos extratos foi realizada em papel Whatman N°1 utilizando o sistema de solvente: acetato de etila: piridina: água na proporção de 8:2:1 (v:v:v). Os monossacarídeos foram revelados pela utilização de nitrato de prata (TREVELYAN,1950).

4.3.2.1 Razão entre os monossacarídeos M e G

Após a obtenção das imagens da cromatografia por meio de sistema digital direto, foi utilizado o programa ImageJ para o cálculo da densidade dos carboidratos na imagem.

4.3.3 Formação de filmes e esferas

Os filmes de alginatos foram preparados pelo método de evaporação do solvente, onde uma solução de alginato de sódio em concentrações diferentes posta sobre uma placa de vidro foi posta em contato com uma solução de cloreto de cálcio durante 5 minutos. O excesso foi drenado e os filmes foram secos em temperatura ambiente. As esferas de alginatos foram preparadas por extrusão de uma solução de alginato de sódio de concentração conhecida, através de uma agulha equipada a seringa, para uma solução de cloreto de cálcio. Depois de 5 minutos após o contato, as esferas foram filtradas e secas a temperatura ambiente. Ambas as metodologias foram adaptadas do trabalho de (HERMES E NARAYANI 2002).

4.3.3 Análises químicas

4.3.3.1. Ácidos urônicos

O conteúdo de ácido urônico foi determinado pela reação do carbazol, segundo Dische (1974), utilizando-se como padrão ácido D-glucurônico, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro a 525 nm.

4.3.3.2. Açúcares totais

Açúcares totais foram determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico, de acordo com Dubois e col. (1956), empregando-se como padrão o ácido β -D-glucurônico, sendo as leituras realizadas a 490 nm.

4.3.3.3. Proteína

O conteúdo de proteína foi determinado com o reagente de Coomassie blue R segundo o método de Bradford (1976), e a leitura realizada a 595 nm, empregando-se como padrão albumina de soro bovino.

4.3.3.4 Sulfato

O sulfato total foi medido após hidrólise ácida (HCl 6N, 6 horas, 100°C) por turbidimetria, a 500nm pelo método da gelatina-bário (DOGSON & PRICE. 1982), com o sulfato de sódio empregado como padrão.

4.3.4. Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectrômetro Perkin-Elmer, de 4400 a 400 cm^{-1} . Os polissacarídeos (cerca de 5 μg) foram analisados após secagem em aparelho de Abdenhalden, sob a forma de pastilha de KBr contendo P_2O_5 a 60°C.

4.4. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

4.4.1. Ensaio de Proliferação Celular (MTT)

A análise do efeito citotóxico dos alginatos deste estudo foi realizada pelo método descrito por Mosmann (1983). Este ensaio é baseado na transformação e quantificação do MTT [3-(4,5- Di-metiltiazol-2-il)-2,5-brometo difenil- tetrazolio]. Onde enzimas da cadeia respiratória reduzem o MTT gerando cristais de formazan, que são insolúveis em água e de cor violeta, no interior das células. A quantidade desses cristais pode ser determinada espectrofotometricamente e serve para estimar o número de mitocôndrias e, portanto, o número de células vivas na amostra.

Para manutenção das culturas foi utilizado o meio DMEM com penicilina/estreptomicina (liofilizadas em pó, 10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina por mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%) da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e Soro Fetal Bovino (SFB) da Cultilab (Campinas, SP, Brasil). Foram utilizadas células da linhagem HeLa (adenocarcinoma cervical - ATCC CCL-2)

e células de fibroblastos de camundongos (3T3). As células foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 1×10^6 células/poço e incubadas com o polissacarídeo a 37°C, 5% de CO₂, ao tempo de 24, 48 e 72 horas. Ao final destes períodos foi adicionado 10µl de MTT, seguindo a incubação por 4h. Em seguida foi adicionado 100µl de ácido isopropanol 0,04N aos poços e misturado para dissolver os cristais de formazan azul-escuro com leitura a 570nm. (MOSMANN, 1983).

4.4.2. Atividade antioxidante

Para obtenção dos dados que indicam a capacidade dos alginatos em prevenir e/ou bloquear a transferência de elétrons de compostos redutores para substratos oxidantes foram realizados os seguintes ensaios:

4.4.2.1. Capacidade antioxidante total (CAT)

Alíquotas de 0,1mL das amostras (n=3) foram diluídas em água em diferentes concentrações e combinadas com 1 mL de solução reagente (0,6M de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio). Esta solução foi então mantida a 100 °C por 90 minutos e depois resfriada. Após resfriamento a temperatura ambiente as atividades foram monitoradas espectrofotometricamente pela formação de Mo⁺⁵ a partir do Mo⁺⁶, formando fosfomolibdênio que apresenta absorvância máxima de 695nm (PRIETRO et AL., 1999). Concentrações diferentes de ácido ascórbico foram usadas para obtenção de uma curva padrão. O resultado da atividade antioxidante total do alginato foi exposto como percentual em relação ao padrão de ácido ascórbico.

4.4.2.2. Varredura de radical hidroxila

O seqüestro de radicais hidroxilas foi determinado pelo método de Sminorff & Cumbers (1989) modificado. Onde 0,5 mL de concentrações variadas (0,08 – 5,0 mg/mL) do alginatos foram adicionados a 0,5 mL de fenatrolina (5mM/L), 0,75 mL de tampão fosfato (20mM; ph 7,4) e 0,5 mL de Fe₂SO₄ (7,5 mM/L). Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de H₂O₂ a 15% e a mistura incubada a 37°C por 90 minutos. Após incubação, a mistura foi centrifugada (1200 rpm por 5 minutos) com leitura realizada a 536 nm. A atividade sequestradora de radicais hidroxila foi determinada pela

seguinte fórmula: $(\%) = (1 - A_{\text{amostra}} / A_{\text{controle}}) \times 100$, onde A_{controle} se refere à absorvância da mistura na ausência da amostra teste e A_{amostra} se refere a absorvância da mistura na presença da amostra.

4.4.2.3 Quelação de férrica

A ação quelante de ferro foi determinada utilizando-se de 0,2mL da amostra em concentrações variadas (0,08 – 5,0mg/mL) misturadas com 0,025mL de sulfato de ferro (2 mM) e incubadas por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esse tempo, 0,1 mL de ferrosina (5 mM) foi adicionada, e a mistura incubada por mais 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada água destilada para completar 2 mL e a leitura foi feita a 562 nm. O percentual da atividade quelante foi determinada pela fórmula: taxa de atividade quelante (%) = $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$, onde A_{controle} é a absorvância da mistura na qual a amostra teste foi substituída por água destilada e A_{amostra} se refere a absorvância da mistura na presença da amostra teste (SALTARELLI et al., 2009).

4.4.2.4 Teste do poder redutor

O poder redutor dos alginatos foi quantificado de acordo com metodologia previamente descrita (ATHULORALA et al., 2006; WANG et al., 2008). Alíquota de 4 mL da reação contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos em tampão fosfato (0,2 M, pH 6,6) e ferricianeto de potássio (1%) foram incubados por 20 minutos à temperatura de 50 °C. A reação foi terminada com a adição de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e posteriormente adicionou-se água destilada e cloreto de ferro (0,1%) e então a absorvância aferida a 700 nm. O resultado foi expresso em percentual em relação ao ácido ascórbico como padrão. Para o controle negativo foi utilizado o tampão fosfato e como branco da reação, todos os reagentes foram utilizados com exceção do FeCl_3 , o qual foi substituído por água destilada.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análises estatísticas dos modelos experimentais utilizou-se o Teste de Tukey- Kramer, para determinar que grupos diferem entre os valores obtidos para os grupos controle e experimental, com valores significantes para $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Rendimento

Para a extração do alginato de sódio, 5g do pó cetônico da alga marinha foi utilizado. Durante o processo de extração e de acordo com a metodologia utilizada o alginato de cálcio é transformado em alginato de sódio, pois o mesmo é solúvel em água, diferente do anterior. Ao final da extração obteve-se 3,3g de alginato de sódio parcialmente purificado. O rendimento final obtido do extrato de alginato foi de 66% em relação ao peso do pó cetônico inicial da alga (5g). Para a sulfatação (WANG, 2005) foram utilizados 1g do alginato de sódio parcialmente purificado. Como resultado obteve-se 0,188g de alginato sulfatado após a realização de todo o procedimento, correspondendo a 18,8% do valor inicial do alginato nativo (tabela 3).

Tabela 3: Rendimento (%) dos alginatos nativo e sulfatado

Alga seca	Alginato nativo (AN)	Alginato Sulfato (SA)	Rendimento
5,0g	3,3g	-	66% ^a
-	1,0g	0,2g	20% ^b

Legenda: ^aExtração do AN a partir da alga seca; ^bGeração do AS a partir do AN

6.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL

6.2.1. Eletroforese em gel de agarose

No sistema de eletroforese em gel de agarose os compostos sulfatados, quando presentes, interagem com a diamina e são posteriormente precipitadas com o cetavlon (CTV 1%). Sua visualização dá-se através de uma coloração arroxeadada, promovida pela interação com o corante azul de toluidina 0,1%. Podemos então observar que os alginatos expostos ao processo de sulfatação (WANG, 2005) apresentaram

metacromasia com esse corante, comprovando que a amostra apresenta grupamentos sulfato em sua estrutura (Figura 8A).

Após a coloração das amostras sulfatadas foi então realizada o que denominamos de dupla descoloração, onde a lâmina é imersa primeiramente numa solução composta em acetato de sódio 0,2M, pH 5,8 para que os grupos carboxila das moléculas sejam ativados e corem quando forem novamente imersos no corante azul de toluidina 0,1%. Observamos que o alginato nativo pode ser visualizado após este processo, indicando a presença de carboxilas no composto, confirmando a extração de um composto carboxilado e não sulfatado. A banda referente ao AN (Alginato Nativo) apresentou coloração rosada característica de compostos carboxilados, estando também homogênea e pouco polidispersa (Figura 8B).

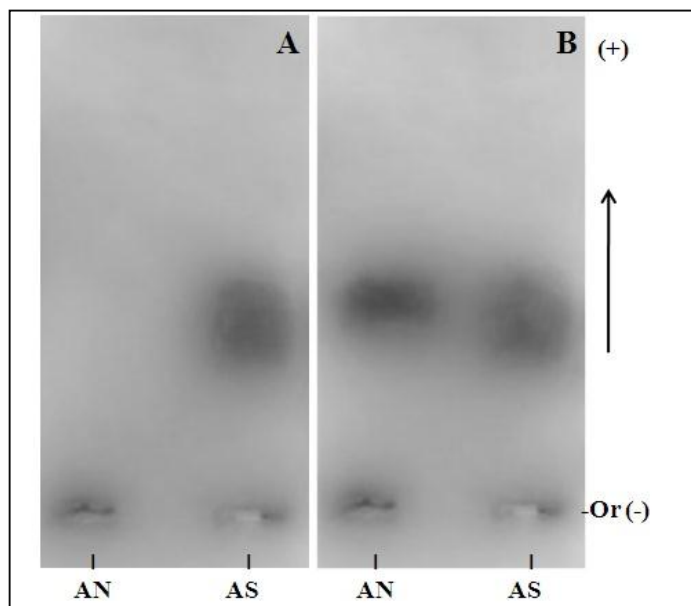


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA dos alginatos Nativo e Sulfatado da alga marinha marrom *L. variegata*. Cerca de 50µg de cada fração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05M, pH 9,0. **(A)** A visualização dos polissacarídeos foi feita com azul de toluidina 0,01%. **(B)** Mesma eletroforese da figura 8 A, descorada com acetato de sódio, conforme métodos. **Legenda:** Or – origem; → sentido da corrida.

6.2.2. Composição monossacarídica e razão M/G dos alginatos AN e AS

A composição monossacarídica presente na amostra de alginato foi caracterizada por cromatografia descendente em papel após a realização de hidrólise ácida dos compostos. A maior liberação de monossacarídeos foi observada em 2h de hidrólise a 100 °C utilizando HCl 4N após a realização de uma curva de hidrólise (dados não mostrados). A figura 9 comprova a existência dos monossacarídeos encontrados em alginatos: o ácido β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G) para a alga *L. variegata*. Observamos ainda certa contaminação com outros monossacarídeos para os alginatos obtidos comercialmente, que podem ser visualizados próximo a origem de aplicação das amostras, o que não ocorreu com os alginatos extraídos pela nossa metodologia. Este dado foi interessante, pois revela uma purificação do AN e também do AS em relação a presença dos açúcares somente existentes em alginatos. Outro dado interessante foi em relação a sulfatação, pois mesmo após este processo químico, o alginato da alga *L. variegata* não apresentou alteração no perfil dos açúcares do alginato (tabela 3).

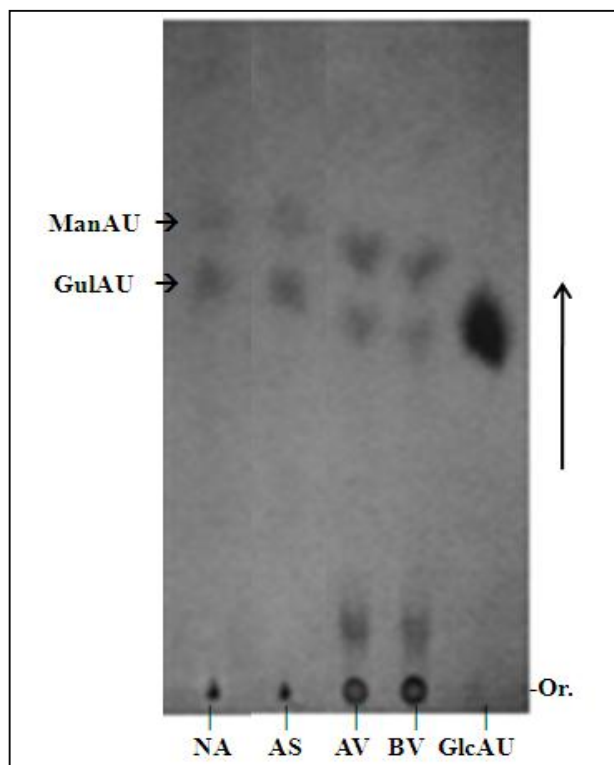


Figura 9. Cromatografia descendente em papel das amostras de alginato nativa e sulfatada. Sistema de solvente: acetato de etila: piridina: água. Legenda: **GulAu**: ácido gulurônico, **ManAU**: ácido manurônico, **GlcAU**: ácido glicurônico. **BV**: alginato comercial de baixa viscosidade, **AV**: alginato comercial de alta viscosidade, **AN**: alginato nativo de *L. variegata*, **AS**: alginato sulfatado de *L. variegata*. **Or.**: origem; (→): sentido da cromatografia.

Após análise da cromatografia pelo programa imagej observamos que a razão dos blocos M/G foi de 1,05 para a amostra nativa e de 1,1 para amostra sulfatada, indicando um maior similaridade do AN e AS com a amostra de alta viscosidade (AV) utilizada no controle (Tabela 4).

Tabela 4: Composição monossacarídica e razão M/G do AN e AS

Alginatos	Picos por área		Razão
	Blocos G	Blocos M	M/G
AN	70,53	73,82	1,05
AS	74,09	81,48	1,10
AV	69,16	81,96	1,18
BV	70,25	84,12	0,83

Legenda: AN – Alginato nativo; AS –Alginato sulfato; AV – Alginato comercial de alta viscosidade; BV – Alginato comercial de baixa viscosidade (utilizados como padrão).

6.2.3. Análises físicoquímicas

A composição química do extrato do alginato nativo e sulfatado é mostrada na Tabela 5. Os resultados indicam que a amostra é composta por polissacarídeos (42% para a nativa e 39% para a sulfatada) e ácido urônico (65% para a nativa e 60% para a sulfatada) e uma baixa contaminação protéica (0,36% para a nativa e 0,36% para a sulfatada). A amostra sulfatada apresenta sulfato na sua estrutura (28% para a sulfatada).

Tabela 5

Composição química (%) do AN e AS da alga *L. variegata*

Alginatos	Açúcares totais ^a	Proteína ^b	Ácido urônico ^c	Sulfato ^d
NA	42	0,36	65	0
SA	39	0,36	60	28

Legenda: AN –Alginato nativo; AS –Alginato sulfato; ^aDubois et al. (1956); ^bSpector (1978); ^cDische (1974); ^dDodgson & Price (1962).

6.2.4. Espectroscopia de infravermelho

Na espectroscopia de infravermelho dos alginatos, pode se observar que a região entre 3600–1700 cm^{-1} apresenta duas bandas: uma banda larga centrada em 3432 cm^{-1} , atribuída a vibrações de alongamento entre o hidrogênio ligado ao oxigênio, O–H, e a vibração assimétrica do carboxilato O–C–O que ocorrem no pico de 1637 cm^{-1} . A banda fraca em 1174 cm^{-1} pode ser atribuída a C–O, C–S e C–C vibrações de alongamento do anel de piranose, enquanto que a banda em 1122 cm^{-1} pode ser, também, devido a C–O vibrações de alongamento (MATHLOUTHI & KOENIG, 1986; SILVERSTEIN, CLAYTON BASSIER & MORRILL, 1991). A região de impressão digital ou anomérica (950–750 cm^{-1}) é a mais discutida em carboidratos (MATHLOUTHI & KOENIG, 1986; TUL'CHINSKY et al, 1976) e o espectro mostra a banda em 908 cm^{-1} que é atribuída a C–H vibrações anomérica de deformação de resíduos de ácido α -L-gulurônicos, e em 862 cm^{-1} que atribuí-se a C1–H vibrações de deformação de resíduos de ácido β -manurônico, (Figura 10)

A banda em 680 é provavelmente devido às vibrações de deformação de porções de COH, CCH e OCH nos resíduos de ácido α -L-gulurônicos com contribuições nas vibrações de deformação da curvatura de ligações glicosídicas C–O–C em blocos de homopolímeros (CHANDI'Á, MATSUHIRO & VA'SQUEZ, 2001; CHANDI'Á et al, 2004).

Adicionalmente na espectroscopia de infravermelho do extrato de alginato sulfatado pode-se observar que o pico em 1214 cm^{-1} é indicativo da presença do grupo sulfato, S=O (KARMAKAR et al., 2009; BERNARDI e SPRINGER, 1962).

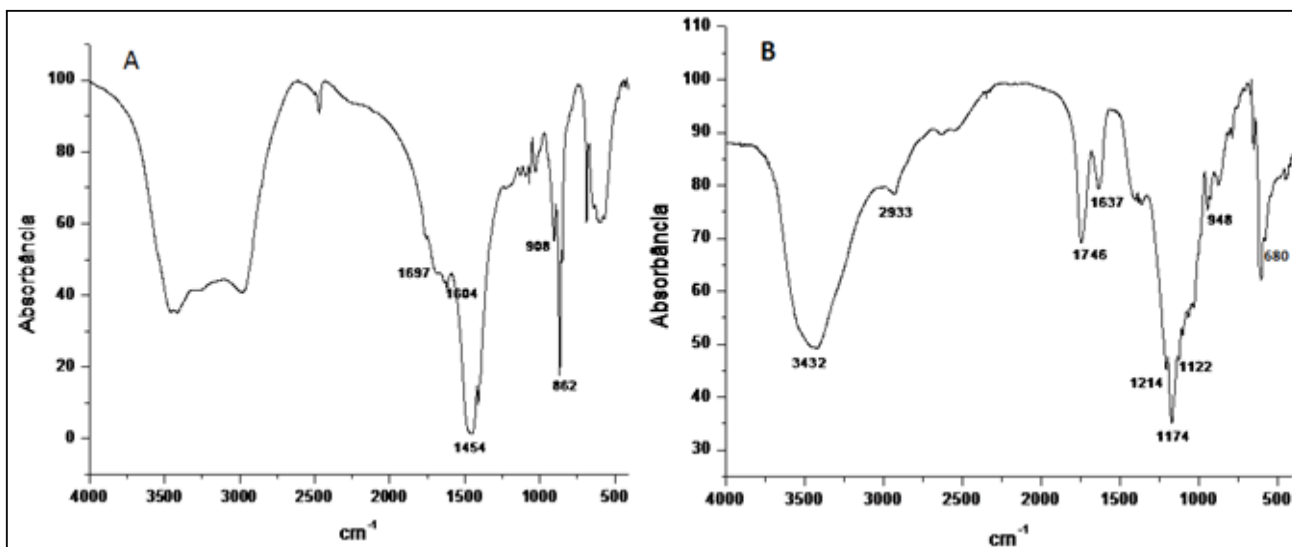


Figura 10. Espectro de infravermelho do alginato nativo (A) e sulfatado (B) da alga *Lobophora variegata*. Cerca de 50 mg das amostras foram submetidas a espectroscopia de infravermelho entre 4000 at 500 cm^{-1} .

6.2.5 Formação de filmes e esferas

Com o objetivo de ver o potencial biotecnológico como também comprovar mais uma vez a extração do alginato foi feito o teste para formação de filmes e esferas. Após o contato dos alginatos nativos com a solução de cloreto de cálcio pode-se observar a formação de filmes em diferentes concentrações, onde a solução mais concentrada (Figura 11 D) formou um filme mais espesso e consistente comparando com as soluções menos concentradas. A partir da solução a 6% foi verificado a formação de esferas de alginatos. Tais dados necessitam de mais análises no sentido de melhorias no processo de síntese dos filmes e esferas como também na análise de suas características físico-químicas. Entretanto, os dados visualizados na figura 12, comprovam a capacidade gelificante do alginato extraído indicando que o mesmo possui um excelente potencial como possível meio biotecnológico.

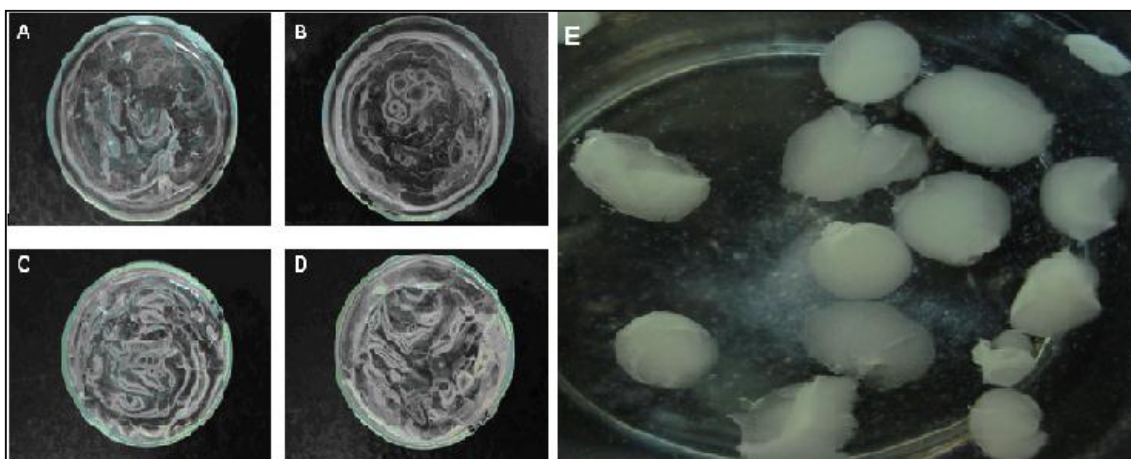


Figura 11: Géis A- Alginato 1%; B- Alginato 2%; C- Alginato 4%; D- Alginato 6% e esferas E- de alginato a 6% extraídos da alga *L. variegata*.

6.3. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

6.3.1. Ensaio de Proliferação Celular (MTT)

6.3.1.1 Teste Utilizando Células De Fibroblastos (3t3)

Observamos que após 24h de incubação das células com *L. variegata* na concentração 25µg e 50µg da amostra natavia e 100µg da amostra sulfatada houve um aumento significativo $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,01$ respectivamente na viabilidade celular (Figura 12 A), também houve esse aumento significativo na concentração de 50µg da mostra nativa $p < 0,001$ (Figura 12 B) em 48h e na concentração de 25 µg da amostra nativa em 72h (Figura 12 C) $p < 0,001$.

6.3.1.2 Teste Utilizando Células De Câncer Cervical (Hela)

Quando ás células HeLa foram incubadas com *L. variegata*, nas primeiras 24h houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações 25 e 100µg da amostra nativa e em 100µg para amostra sulfatada, $p < 0,001$ (Figura 13 A). Quando incubadas por 48 horas observou-se diferença estatisticamente significativa para as concentrações 100µg da nativa $p < 0,001$ e em 25, 50 e 100µg para amostra sulfatada com $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$ respectivamente (Figura 13 B). Quando incubadas por 72h houve diferença estatisticamente significativa para as concentrações 25, 50 e

100µg da amostra nativa com $p < 0,001$ e 50 µg e 100µg para amostra sulfatada com $p < 0,001$ (Figura 13 C).

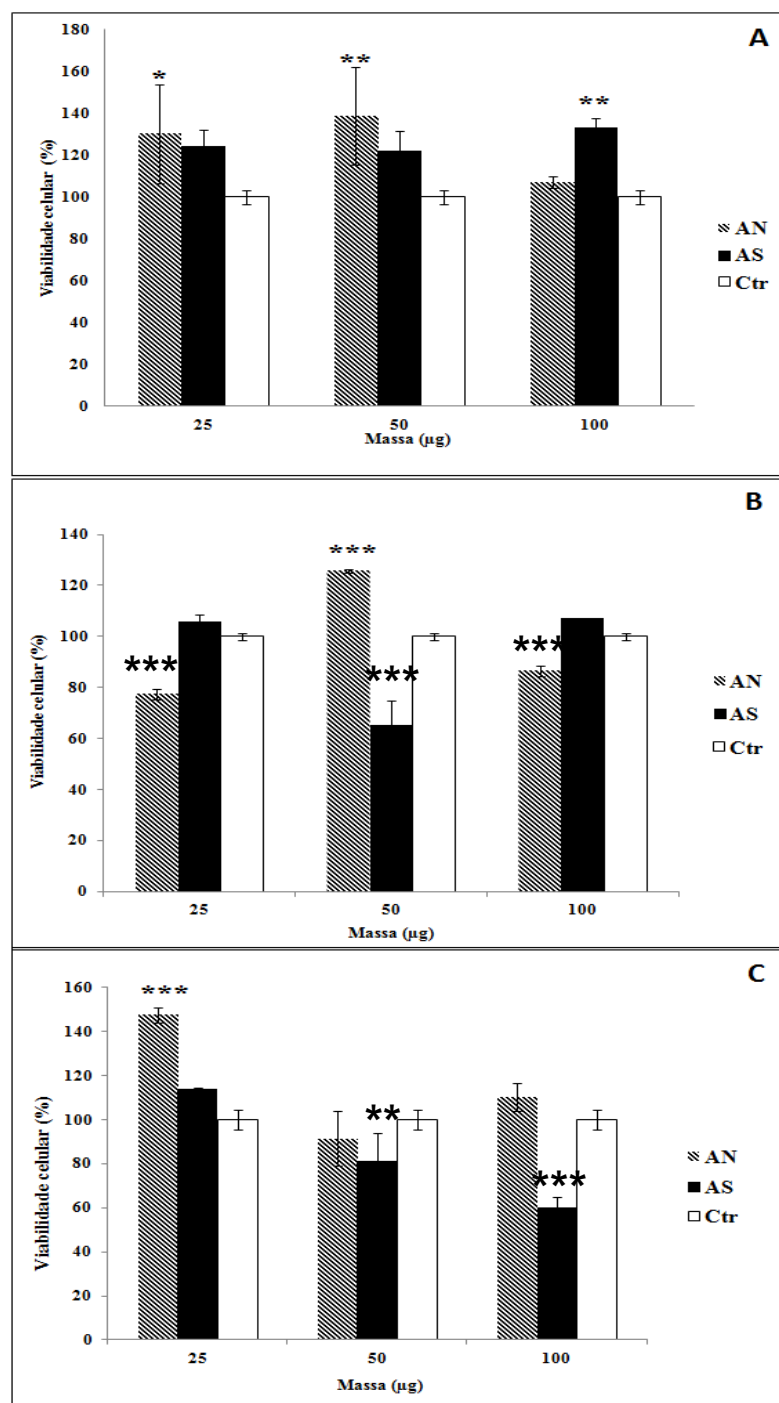


Figura 12 - Efeito do extrato do alginato nativo e sulfatado na proliferação de fibroblastos (células 3T3). Células 3T3 tratadas com 25, 50 e 100 µg de alginato nativo e

sulfatado, por 24 horas (A), 48 (B) e 72 horas (C). Nível de significância em relação ao controle: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. Valores são médias percentuais +- desvio padrão.

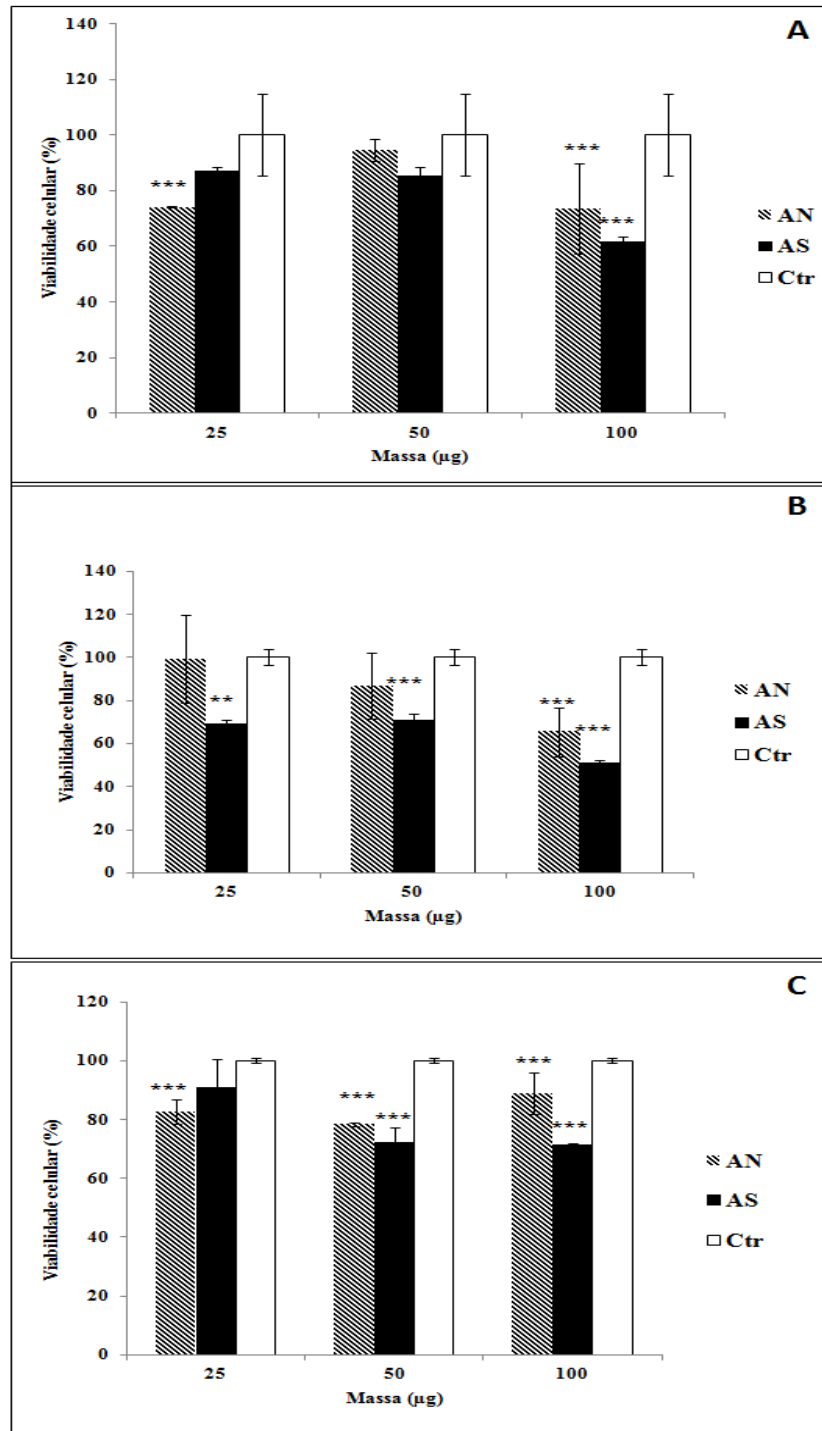


Figura 13 - Efeito do extrato do alginato nativo e do sulfatado na proliferação de células de câncer cervical (células Hela). Células Hela tratadas com 25, 50 e 100 µg de

alginato nativo e sulfatado, por 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Nível de significância em relação ao controle: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$. Valores são médias percentuais \pm desvio padrão.

6.3.2. Atividade antioxidante

6.3.2.1. Capacidade antioxidante total (CAT)

De forma geral, foi mensurada a capacidade antioxidante total das amostras em forma de porcentagem (figura 14). Observou-se que os alginatos apresentaram capacidade antioxidante distintas onde o AN mostrou capacidade antioxidante total de aproximadamente 7% enquanto o AS teve um aumento de CAT de três vezes em relação ao NA, chegando a 30%.

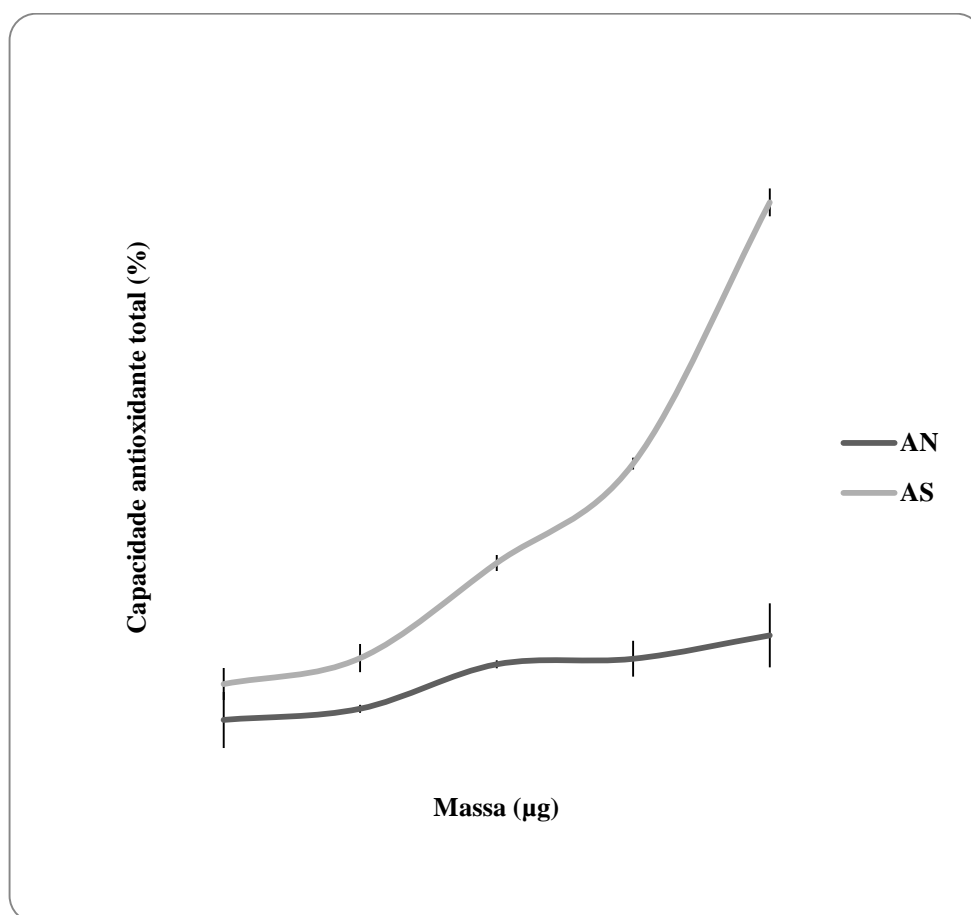


Figura 14 - Atividade antioxidante total dos alginatos nativos e sulfatados da alga *Lobophora variegata*, *in vitro*. Os valores expressos em miligrama de ácido ascórbico por grama de amostra.

6.3.2.2. Inibição do radical hidroxila

A figura 15 mostra a ação dos alginatos sobre a varredura do radical hidroxila. Pode-se observar um efeito de inibição desse radical por ambos alginatos nas concentrações testadas, promovendo o seqüestro desses radicais da ordem de até 90%. (Figura 15).

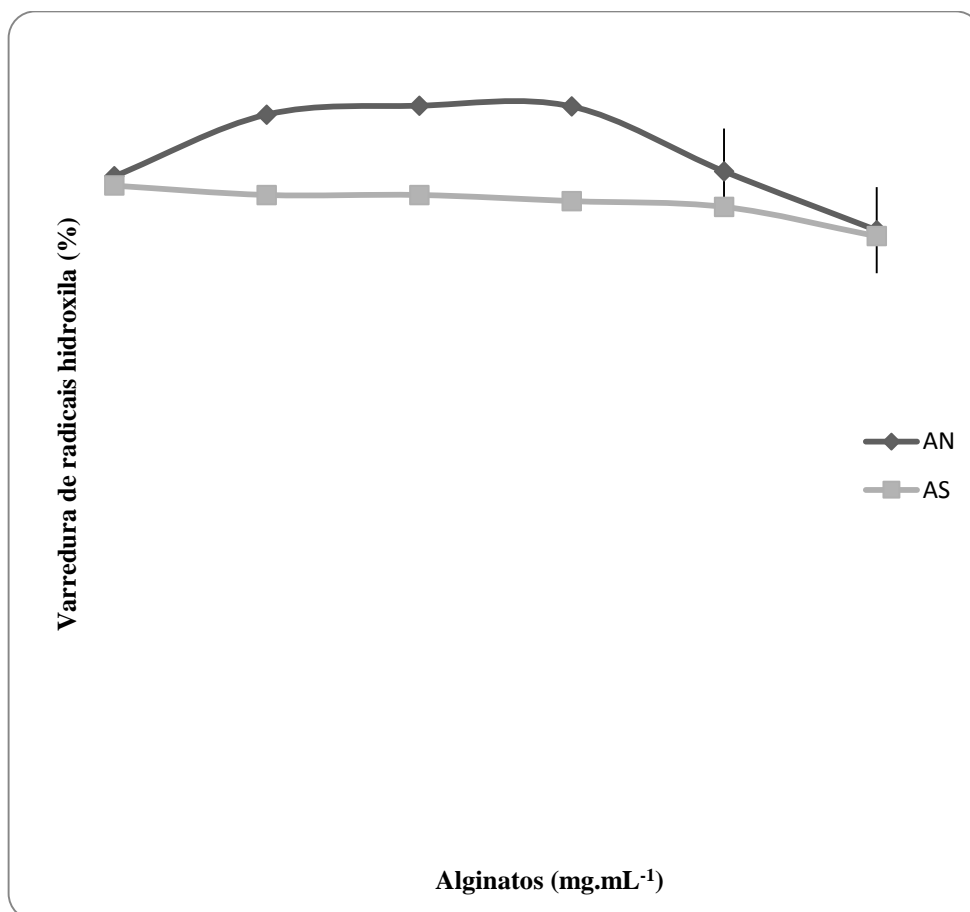


Figura 15: Ensaio varredura dos Radicais Hidroxila. Valores foram expressos por médias \pm desvio padrão (n=3).

6.3.2.3. Teste do poder redutor

O poder redutor da amostra foi determinado pelo método de Yen e Chen (1995) com modificações (YUAN et al., 2005). A redução de Fe⁺³ para Fe⁺² implica na formação do complexo azul da Prússia com consequente aumento da absorvância

(KEHRER, 2000). Assim, uma alta absorbância da mistura de reação indica alto poder redutor.

A figura 16 mostra alto poder redutor do AS, onde o percentual de inibição oscilou entre 48 e 78%. Já o AN revelou, nas mesmas condições, um excelente potencial redutor na primeira massa testada, chegando a 82%, porém, à medida que se aumentou a concentração da amostra, o poder redutor diminuiu a 39%.

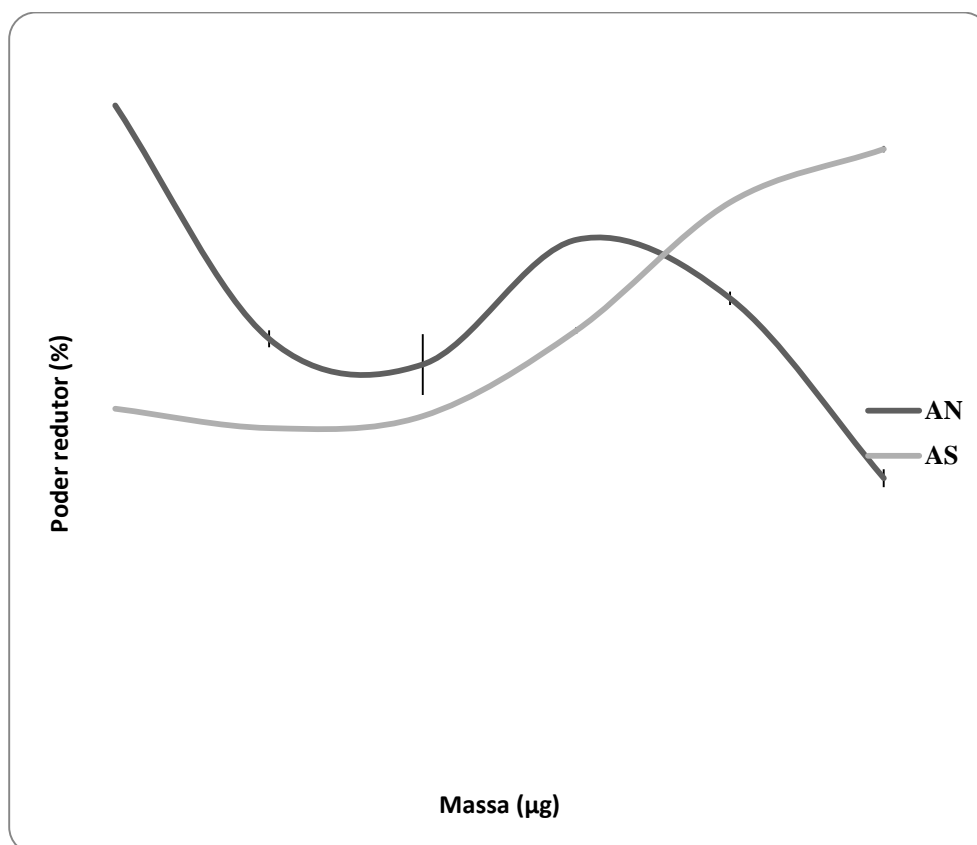


Figura 16: Poder redutor das diferentes concentrações de AN e AS de *L. variegata*. Valores foram expressos por médias \pm desvio padrão (n=3).

6.3.2.4. Quelação do íon ferro (Fe^{++})

A figura 17 apresenta os perfis de quelação do íon ferro dos polissacarídeos em estudo. O AN apresentou efeito dose dependente promovendo um efeito de 100% atingindo um platô a partir de 0,31µg. Já o AS mostrou uma baixa atividade quelante, em torno de 6,5% quando foi utilizada a massa de 5µg.

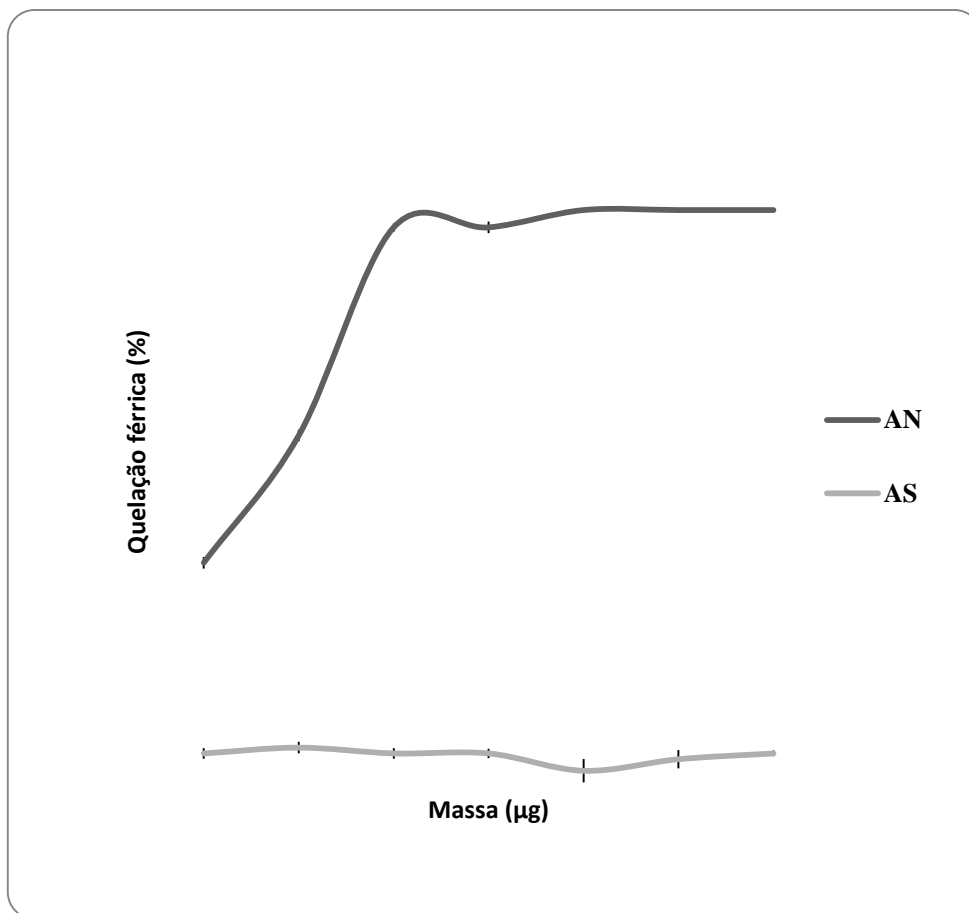


Figura 17 – Atividade quelante do íon ferro das diferentes concentrações de NA e AS de *Lobophora variegata*. Valores expressos por médias \pm desvio padrão (n=3)

7. DISCUSSÃO

Como se pode observar, a extração dos alginatos de diversas partes de algas, incluindo folíolos e caulídios, pelo método descrito por Cameron et al. (1948), modificado posteriormente por Durairatnan & Nascimento (1984), apresentou um alto rendimento, visto que este foi cerca de 66% do pó centônico da alga para os alginatos nativos, conferindo assim uma alta reprodutibilidade desse método. Esse alto percentual nos faz crer que há uma alta participação desta molécula na estrutura que compõe as algas pardas, o que corrobora quando comparado ao trabalho de Kloareg e Quatrano (1998), que mostra a presença dos polissacarídeos ácidos na matriz amorfa da parede celular de algas marrons. Dietrich et.al.(1995) e Leite et al. (1998), também verificaram a presença desse componente como contaminante de fucanas outro polissacarídeo ácido, mas sulfatado com alto potencial farmacológico. Os alginatos extraídos de bactérias e algas têm sido bastante estudados e procurados pelas indústrias alimentícia e farmacêutica, uma vez que são fontes naturais, apresentam um alto rendimento no processo de extração sendo assim viável por este ser de baixo custo e no fim do processo se ter um composto parcialmente purificado. Diante destes fatores e de termos ampla costa rica de diversas algas marrons propomos este estudo para elucidar possíveis agentes terapêuticos com baixo custo, alto rendimento e abundantes no nosso litoral.

A contaminação protéica é um grande problema durante a purificação de polissacarídeos. Contudo, os resultados obtidos (0,36% para ambas) (Tabela 1) se mostrou muito abaixo dos encontrados na literatura. Esse fato é positivo para os alginatos extraídos, uma vez que, a contaminação proteica pode ser prejudicial nas análises das atividades farmacológicas, demonstrando mais uma vez a qualidade do nosso processo de extração. Além da baixa contaminação nossa amostra apresentou uma grande quantidade de ácido urônico e açúcares totais e de acordo com o perfil eletroforético a coloração da banda do alginato nativo não apresentou uma polidispersão evidente comparado a banda do alginato modificado quimicamente.

A metodologia para eletroforese aplicada aos alginatos foi baseada na mesma utilizada para detecção de glicosaminoglicanos sulfatados (DIETRICH & DIETRICH, 1976). Nesta é possível somente a visualização dos compostos sulfatados, que são corados pela solução de azul de toluidina, evidenciando assim a sulfatação do alginato

obtida quimicamente. A coloração dos compostos carboxilados só pode ser verificada após a imersão da lâmina em solução de tampão acetato de sódio 0,2M pH 5,8 para a então a visualização dos ácidos urônicos (NEWTON et.al., 1974). Alves (2000) também caracterizou alginatos extraídos de diferentes partes da alga *Sargassum vulgare*, onde os mesmos também apresentaram coloração característica de compostos carboxilados.

O alginato sulfatado quimicamente apresentou rendimento, em torno de 20% em relação ao alginato nativo. Isso pode ser explicado pelo fato que a sulfatação apresentada por Wang (2005) se emprega à glucanas (compostos neutros) ou pela pouca disponibilidade estrutural dos alginatos à sulfatação. A sulfatação pode ser comprovada pela metacromasia com o corante azul de Toluidina na eletroforese em gel de agarose descrita pelo método de Dietrich & Dietrich (1976), mostrando certa polidispersão do ácido algínico sulfatado e pela espectroscopia de infravermelho que detectou pico de 1214 cm^{-1} que é indicativo da presença do grupo sulfato, S=O (KARMAKAR et al., 2009; BERNARDI e SPRINGER, 1962).

Técnicas de hidrólise para separação e análise de ácido algínico permitiu a determinação da composição desse composto. As condições de hidrólise utilizadas para a molécula do alginato de *L. variegata* (HCl 4N, por 2 h, à 100°C) permitiu a separação monossacarídica da molécula e posterior verificação de seus constituintes por cromatografia descendente em papel foi anteriormente descrita por Alves (2000) para a separação dos monossacarídeos dos alginatos de *S. vulgare*. A cromatografia comprovou a presença dos constituintes monossacarídicos presentes na estrutura do alginato, os ácidos urônicos (β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico) já descrito como parte constituinte dessa molécula por vários outros autores e também que as condições de hidrólise do polímero foram favoráveis a separação monossacarídica total (SMIDSROD et al, 1973, LIN & HASSID, 1966, SKJAK-BRAEK et al., 1986, BLANDINO, MACÍAS e CANTERO, 1999; STABLER et al., 2001, DRAGET, K.I.; SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. 2005). Outro ponto verificado foi a presença de contaminantes nos alginatos comerciais, ao contrário do extraído nesse trabalho colaborando uma vez mais para a eficácia da metodologia de extração utilizada. Quanto a relação M/G, nossos dados sugerem que o alginato extraído possui

quantidades homogêneas de ácidos manurônico e gulurônico. Resultados de Jian et al. 2014, mostraram alginatos com razões entre M/G de 1,1 próximas às encontradas nos nossos alginatos. Fenoradosoa et al., 2010, também caracterizaram um alginato com proporção M/G de 0,94, comum em algumas espécies do gênero *Sargassum*. Para estabelecer um contraponto, no mesmo estudo, a alga *Sargassum filipendula* apresentou alginato com relação M/G de 0,19. Sendo assim concluímos que há realmente uma variação entre esta relação e segundo alguns autores, reside justamente nesta relação, o rol de atividades biológicas que um alginato pode desempenhar (Zhao et al., 2013).

Outra característica do alginato é a força do seu gel. Atualmente é ampla a utilização de esferas de alginato na biotecnologia servindo de carreadores de partículas ou proteínas. Interações entre a albumina e alginato foram descritos por NEISER, DRAGET e SMIDSDORT (1999) e LEONARD et al. (2004). Estudos recentes de partículas contendo insulina foram realizados por SILVA et al. (2006) e SARMENTO et al. (2006), assim como interações entre partículas de uma mistura de alginato/quitosana (PAN et al., 2002; AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004) e alginato/agarose (SAKAI; HASHIMOTO; KAWAKAMI, 2006). Alginatos também apresentam potencial para a fabricação de biofilmes e filmes, devido às suas propriedades coloidais. Esses filmes são utilizados como matrizes de suporte para regeneração e crescimento de celular, para a formação de um novo tecido, além de desempenhar uma função estrutural, ajustando-se aos defeitos anatômicos (REZENDE ET AL., 2007). Nosso composto se mostrou favorável a formação desses filmes e esferas, comprovando o seu potencial biotecnológico. Estudos serão realizados para termos conhecimento da força deste gel e em que tecnologias poderá ser aplicado.

Os resultados obtidos com as análises químicas corroboraram com os dados sobre a estrutura química da molécula do alginato descrita anteriormente na literatura (STANFORD, 1881; ANDRADE et al., 2004; DRAGET, K.I.; SMIDSDORT, O.; SKJAK-BRAEK, G. 2005). Pode-se observar também que o alginato sulfatado quimicamente apresentou resultados diferentes com relação à sua composição quando comparado

com o nativo, sendo explicado pelo fato da modificação química pela qual passou a molécula após a inserção do sulfato pela técnica de Wang (2005).

Algumas pesquisas têm sugerido uma relação entre atividades antioxidantes, massa molecular e o grau de sulfatação de polissacarídeos sulfatados de algas (ZHAO et al., 2004; QI et al., 2005). Esta correlação foi observada por Tannin-Spitz et al., (2005), estudando polissacarídeos de *Porphyridium*, os quais mostraram que as frações de polissacarídeos com maior teor de sulfato (4,5%) apresentavam atividade antioxidante 20% superior a outro grupo de polissacarídeos que possuíam 3% de sulfato, quando avaliada pelo método de FOX (WOLF, 1994). De acordo com esses dados anteriores, sugerimos a análise nesses experimentos para ver a diferença nos resultados utilizando a amostra sulfatada em relação à nativa e observar se está de acordo com esses autores.

A literatura mostra alginatos com possíveis atividades antioxidantes Zubia et al. (2008), apresentando atividade varredora de ânion superóxido e radical hidroxila (SO et al, 2007). Segundo Qiao et al. (2009), composto que apresentam atividade antioxidante total e poder redutor, são considerados fortes indicadores de um potencial de atividade antioxidante. A partir de uma comparação com o ácido ascórbico, pode-se inferir que os AS de *L. variegata* apresentou uma maior CAT, cerca de 4 vezes, quando comparados com o AN. Por outro lado, quando se testou a atividade antioxidante através da metodologia de quelação férrica, o NA chegou a 100% de quelação, enquanto o AS permaneceu em um platô oscilando em 6,5%. Esses dados sugerem que o íon ferro forma redes cruzadas com as moléculas de AN realizando assim esta quelação, enquanto o AS, provavelmente devido à sua modificação química, perdeu esta capacidade. Este dado se mostra importante pois a o excesso do íon ferro pode ter efeitos nocivos para a saúde, levando a uma patologia conhecida como “Hemocromatose”, que tem como conseqüências: insuficiência cardíaca, diabetes, cirrose e mau funcionamento de glândulas. Logo nosso composto mostra-se um potente quelante de ferro extraído de uma fonte natural. O sequestro dos radicais hidroxila é muito importante para a defesa antioxidante em células e em sistemas alimentares (ARUOMA, 1998). A geração destes radicais ocorreria pela reação do Fe^{+2} e H_2O_2 . Estudos mostraram que o grupo sulfato dos polissacarídeos poderia reduzir a formação de radicais hidroxilas pela ação quelante de Fe^{+2} (ZOU et

al., 2008) ou com o sequestro do Fe^{+2} pelo alginatos formando géis. Uma vez que os íons metálicos participam da geração dos radicais hidroxila, os agentes quelantes de íons promoveriam a inibição da geração destes radicais (UEDA et al., 1996). Neste estudo o AS apresentou alta inibição dos radicais hidroxila (entre 77-83%) nas concentrações testadas, porém o AN superou estes números na ordem de 78-92% de inibição. O poder redutor apresentado por um composto pode funcionar como um indicador do seu potencial antioxidante (SUN et al., 2009). O poder redutor de AN e AS variou entre 39-82%. A curva apresentada pelos dois compostos, quando comparadas ao ácido ascórbico afirma que ambas amostras possuem elevado poder redutor e que esta função não foi afetada pela sulfatação. Zhao et al. (2012) demonstrou alginatos de baixo peso molecular que possuíam alta atividade antioxidante, entre 70-100%, nas metodologias de varredura de radicais hidroxila e superóxido e peroxidação lipídica. Diante dos resultados expostos, concluímos que, de acordo com a metodologia de atividade antioxidante, a sulfatação não parece desenvolver papel crucial para a ação (tabela 6) e ainda que os alginatos extraídos de *L. variegata* se mostram como promissora fonte natural com capacidade antioxidante, podendo desenvolver seu papel tanto na indústria farmacêutica como na de alimentos.

Tabela 6: Comparação dos efeitos antioxidantes do AN e AS

	CAT	PR	QF	OH
AN	3-7,5%	39-82%	39-100%	78-92%
AS	5-29%	47-77%	3-7%	77-83%

Legenda: CAT: capacidade antioxidante total; PR: poder redutor; QF: quelação férrica; OH: varredura de radicais hidroxila.

As ERO estão envolvidas na patogênese de várias desordens e doenças, tais como: aterosclerose, diabetes, lesões vasculares, inclusive o câncer, e o uso de antioxidantes podem retardar ou até mesmo inibir estes eventos (KANETO, 2010). O AN e AS da alga *L. variegata* apresentou efeitos proliferativos e antiproliferativos frente às células 3T3, em diferentes tempos e concentrações de amostras. Dada a natureza da célula em questão, fibroblastos, acreditamos que os efeitos proliferativos

significantes para estas células quando expostas aos alginatos pode nos oferecer dados importantes, visto que o uso de alginatos no tratamento de feridas e queimados tem sido relatado (DANTAS et al., 2011) e estes tratamentos são baseados principalmente na proliferação de tecido conjuntivo e conseqüentemente, proliferação de fibroblastos, inclusive reduzindo o processo inflamatório decorrente. Efeitos antiproliferativos de alginatos sobre fibroblastos também já foram relatados. Pithon et al., 2010, testando alginatos odontológicos de uso comercial, revelaram atividade citotóxica para quatro marcas testadas. Em relação à sulfatação, para este tipo celular, o AS mostrou-se mais citotóxico. Tal fato pode ser explicado por uma possível adição de grupos químicos não esperados na estrutura do alginato, enquanto o AN apresenta apenas sua estrutura nativa natural. Apesar de ter apresentado certo efeito proliferativo em algumas concentrações testadas para as células 3T3 (células normais), estes mesmos alginatos tiveram um efeito inibitório significativo na viabilidade celular em praticamente todas as concentrações e tempos testados nas células da linhagem HeLa (figura 18).

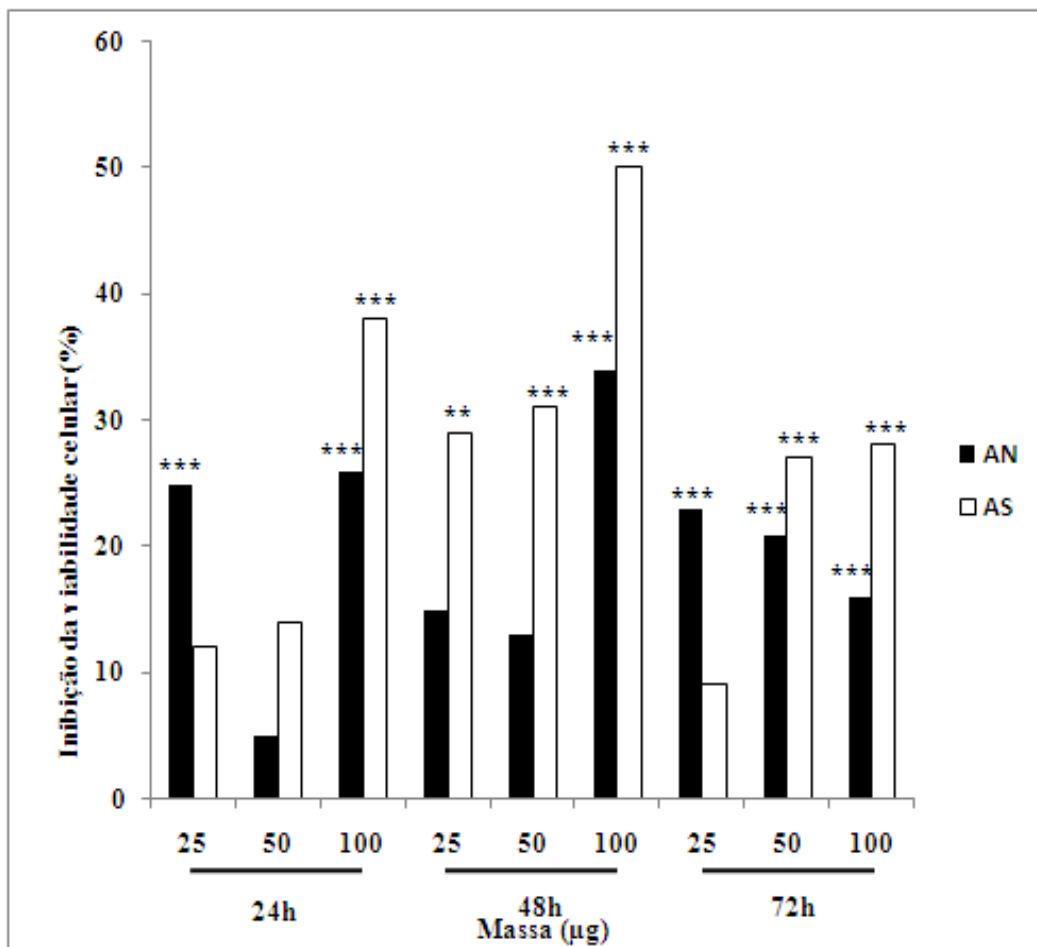


Figura 18 – Taxa de inibição de viabilidade celular do AN e AS em células Hela.

Podemos comparar a boa atividade antiproliferativa do AS, com a atividade antiproliferativa de fucanas. No trabalho de Costa, (2010) as heterofucanas estudadas, extraídas da alga marrom *Sargassum filipendula* apresentaram também atividade anti-proliferativa em células da linhagem Hela por indução de apoptose, aumentando a atividade com o aumento da concentração da amostra, como também foi verificado no efeito antiproliferativo do alginato em linhagem de células HeLa. Fijihara & Nagumo, (1993) também relataram a propriedade antitumoral do alginato de sódio contra tumores de camundongos, sugerindo que a ação biológica do composto poderia estar relacionada com o aumento da atividade fagocítica dos macrófagos, relacionando esse efeito com a composição química (relação M/G) e a seqüência MG nos alginatos.

Contudo, os alginatos ricos em sulfato tiveram uma melhor atividade citotóxica nas maiores concentrações em todos os intervalos de tempo comparados com os nativos mostrando que o sulfato está intimamente ligado a atividade antitumoral como observado em trabalhos realizados com fucanas (HIQASHI OKAI, OTANI, & OKAI, 1999; OKAI & HIGASHI OKAI, 1997; ISHIKAWA et al. 2008; GANESAN et al., 2011). Os nativos por sua vez também tiveram ação citotóxica comparando com o controle corroborando com os estudos de (SOUZA, A. P. A et. al., 2007). Ambos apresentaram baixa toxicidade comparando com os trabalhos de (SINHA, S. et al., 2010; BANDYOPADHYAY et al, 2011). Neste trabalho pudemos constatar alginatos com promissoras atividades farmacológicas, porém estudos futuros serão feitos para melhor elucidar esse processo para que esses possam servir de uso nas diversas indústrias como um composto antioxidante/antitumoral.

8 CONCLUSÃO

A alga *L. variegata* apresenta uma elevada quantidade de alginato em sua composição de acordo com o alto rendimento de sua extração.

O resultado da extração do alginato nativo pelo método de Durairatnan & Nascimento (1984) nos dá amostra parcialmente purificada e com baixo teor de contaminações, que pode ser verificada pelas análises químicas e eletroforese e cromatografia.

A molécula do alginato também é caracterizada pela existência de grupos carboxilados na sua estrutura, que pode ser comprovada pela espectroscopia de infravermelho como também na cromatografia e eletroforese.

A metodologia empregada para a sulfatação do alginato nativo apresentou baixo rendimento, mas sua eficiência foi comprovada na sulfatação dos componentes, através da inserção do grupo sulfato na estrutura da molécula, comprovada pela espectroscopia de infravermelho em conjunto com o resultado da análise eletroforética.

A extração do ácido algínico também teve comprovação pela formação das esferas e filmes de alginatos relatados nesse trabalho.

A amostra de alginato nativo apresentou atividade de proliferação celular em células 3T3 em concentrações mais elevadas em 24, 48 e 72h e em ambas uma significativa atividade antiproliferativa em células da linhagem HeLa, em 24, 48 e 72 horas principalmente nas dosagens mais elevadas. Independentemente da concentração, do tempo e da sulfatação, o alginato foi capaz de reduzir a viabilidade celular de células HeLa.

O extrato do alginato apresentou melhor atividade antioxidante nos testes de quelação férrica e varredura de radical hidroxila e uma menor atividade no teste do poder redutor e capacidade antioxidante total. Estes testes também demonstraram que a sulfatação do alginato não foi crucial para sua atividade.

REFERÊNCIAS

- ADNEN SANAA, ABDENNACER BOULILA, MOHAMED BOUSSAID, NAJEH BEN FADHEL. Alginic acid and derivatives, new polymers from the endangered *Pancreaticum maritimum* L. **Industrial Crops and Products**. n. 44. p. 290-293. 2013.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **J. Control. Release, Amsterdam**, v. 100, p. 5-28, 2004.
- AGUILERA, J. et al., Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. **Marine Biology**, v. 140, p. 12-14, 2002.
- ALLÈGRE, C. J. & SCHNEIDER, S. H. 1994. The evolution of the Earth. *Sci. Amer.*, **271**: 44 - 51.
- ALVES, L. G. - **Heterofucana da alga marinha marrom *Dictyota menstrualis*: caracterização estrutural e ação sobre células endoteliais de aorta de coelho** São Paulo, 2006 [Tese – doutorado- Universidade Federal São Paulo - Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular].
- ALVES, L. G. - **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare***. Natal-RN, 2000 [Dissertação - Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Depto. de Bioquímica].
- AN, Q. D., ZHANG, G. L., WU, H. T., ZHENG, G. S., LUAN., et al. Alginate-deriving oligosaccharide production by alginase from newly isolated *Flavobacterium* sp. LXA and its potential application in protection against pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, 106, 161-170, 2009.
- ANDRADE, L. R. et al. Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell wall of brown algae. **J. Struct. Biol.**, v. 145 p. 216-225, 2004.
- ARASAKI, S. & ARASAKI, T. **Vegetables from sea**. Japan Publications, Inc. Tokyo, 1983.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, p. 199-212, 1998.
- ATHUKORALA, Y.; JUNG, W. K.; VASANTHAN, T.; JEON, Y. J. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, n. 2, p. 184-191, 2006.
- AZEVEDO, T.C.G. et al. Heparinoides algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomedicine & Pharmacotherapy** [s.l.], v. 63, p. 477-483, 2009.
- BADMIS, S., GUPTA, M.K., SURESH, B. Antioxidant activity of the ethanolic extract of *striga orobanchiodes*. **J. Ethno Pharmacol.** 85, 227-230. 2003.

BANDYOPADHYAY, S .S., NAVID, M. H., GHOSH, T., SCHNITZLER, P., RAY, B. Structural features and *in vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacelaria indica*. **Phytochemistry**. 72, 276-283, 2011.

BANERJI, J., L. OLSON, AND W. SCHAFFNER. A lymphocyte-spe- cific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. **Cell.**, V.33, P. 729- 740, 1983.

BERNARDI, G. AND SPRINGER, G.F. Properties of highly purified fucan. **J. Biol. Chem.**, 237, 75–80, (1962)

BERRIAUD, N.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Rheological study on mixtures of different molecular wheight hyaluroates. **Int. J. Biol. Macromol., Guildford**, v.1, n.3, p.137-142, 1994.

BILAN, M. I. et al. – Structure of a fucoidan from thw brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. **Carboh. Res.**, 337: 719-730, 2002.

BIRD, G. M.; HASS, P. the nature of the cell wall constituents of *Laminaria spp.* Manuronic acid. **Biochem Jour.** v. 25, p. 403-411, 1931.

BLANDINO, A.; MACIAS, M.; CANTERO, D. Formation of Calcium Alginate Gel Capsules: Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 88, No. 6, 686-689, 1999.

BOLIN, B.; DEGENS, E. T.; DUVIGNEAU, D. P. & KEMP, S. The global biogeochemical carbon cycle. In Bolin, B.; Degens, E. T.; Kemp, S. & Ketner, P. (eds.), The global carbon cycle. Wiley & Sons. New York, USA. p, 1 – 53, 1977.

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

BRANDÃO HN, DAVID JP, COUTO RD, NASCIMENTO JAP, DAVID, JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim Nova**. v. 33(6), 1359-1369, 2010.

BROWN, B. E. & OGDEN, J.C. Coral bleaching. Scientific American, January, p. 64-70, 1993.

BUENO, S. M.; GARCIA-CRUZ, C. H.; Braz. **J. Microbiol.** 2006, 37, 260.

CAMERON, M. C.; ROSS, A. G. and PERCIVAL, E. G. V. - Methods for the routine estimation of mannitol, alginic acid, and combined fucose in seaweeds. **J.S.C.I.**, 67: 161-164, 1948.

CARDOSO, M. L., BEZERRA, M. E. B.,PAIVA, A. A. O., Carvalho MGF, Benevides NMB, Rocha FA, Leite EL 2010. Assessment of arthritis in a rat model using sulfated polysaccharides. **Planta Med** 76: 113-119.

- CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 60-78, 2007.
- CHANDI'A, N. P.; MATSUHIRO, B.; VA'SQUEZ, A. E. **Carbohydr. Polym.** v.46, p.81-87, 2001.
- CHANDI'A, N. P.; MATSUHIRO, B.; MEJI'AS, E.; MOENNE, A. **J. Appl. Phycol.** V.6, p.127-133, 2004.
- COOPER, GM. A célula – uma abordagem molecular. 2ed. Artmed, Porto Alegre, 2001. p. 633-669.
- COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 64, p 21-28, 2010.
- DEVLIN TM. Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas. São Paulo: Editora Blücher, 2007.
- DIETRICH, C. P., DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. **J Chromatogr.** v. 130, p. 299-304, 1977.
- DIETRICH, C. P., FARIAS, G. G. M., ABREU, L. R. D., SILVA, L. F., LEITE, E. L., NADER, H. B. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acid polysaccharides in three species of the class phaeophyceae. **Plant Science**, v. 108, p. 143-153, 1995.
- DISCHE, Z. - A new specific color reaction of hexuronic acids. **J.Biol.Chem.**, **167**:189.1974.
- DODGSON, K.S.; PRICE, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, v.84, p.106-110, 1962.
- DONATI, I., HOLTAN. S., MORCH Y. A., BORGOGNA, M. DENTINI, M., SKJAK-BRAEK, G., 2005. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels. **Biomacromolecules** 6(2):1031-1040.
- DRAGET, K.; TAYLOR, C. (2009). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications - Food Hydrocoll. 23:251-256.
- DRAGET, K.I.; SMIDSRØD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginates from algae. In: Polysaccharides and polyamides in food industry: properties, production, and patents. **Ed. Steinbuechel**, 2005.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem.**, **28**: 350 -356, 1956.
- DURAIRATNAN & NASCIMENTO, H. C. **Seaweed Res. Utilin.**, 7(1): 39-42, 1984.
- DUVE, C. de 1996. The birth of complex cells. **Sci. Amer.** 274: 50 - 57.

EISELT, P.; YEH, J.; LATTALA, R.K.; SHEA, L.D.; MOONEY, D.J. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. **Biomaterials**, Surrey, v. 21, p. 1921-1927, 2000.

EVANS, L. V., & HOLLIGAN, M. S. Correlated light and electron microscope studies on brown algae. **New phytol.** 71, p. 1161-1172, 1971.

FAN, M. Y., LUM, Z.P., FU, X. W., LEVESQUE, L., TAI, I. T., & SUN, A. M. (1990). Reversal of diabetes in BB rats in transplantation of encapsulation pancreatic islets. **Diabetes**, 39, 519-522.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, [S.1], v. 43, n. 1, p. 61-237. 1997

FORMANEK et al., Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. **Meat Science**, v. 58(4), p. 337-341, 2001.

FUJIHARA, M.; IZIMMA, N.; YAMAMOTO, I.; NAGUMO, T. Purification and chemical characterization of an antitumor polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*. **Carbohydr. Res.** V.125: 97-106, 1984.

FUJIHARA, M.; NAGUMO, T. An influence of the structure of alginate on the chemotatic activity and the antitumor activity. **Carbohydr. Res.**, v.243: 211-216, 1993.

FUJIHARA, M.; NAGUMO, T. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. **Carbohydr. Res.**,v. 224: 343-347, 1992.

GACESA P.; (1992) Enzymic degradation of alginates, **Int. J. Biochem.** v.24, p. 545-552.

GAIL CHAN, DAVID J. MOONEY. Ca²⁺ released from calcium alginate gels can promote inflammatory responses in vitro and in vivo. **Acta Biomaterialia**. N.9 p. 9281–9291. 2013.

GANESAN, P., NODA, K., MANABE, Y., OHKUBO, T., TANAKA, Y., MAOKA, T., et al. (2011). Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia(HL-60) cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA): General Subjects*, 1810, 497–503.

GEORGE, M. ABRAHAM, E., **Journal of controlled released** 114 (2006) 1.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, San Diego, v. 31, p. 267- 285, 1998.

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D.; (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model, **FEBS Lett.** v.32, p. 195-198.

HALLIWELL, B, GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**; v.186: p.1-85. 1990.

HAUG, A.; SMIDSRID O. (1967) Precipitation of acidic polysaccharides by salts in ethanol-water mixtures, **J. Polym. Sci.** 16, 1587-1598.

HAY, I.D., REHMAN, Z.U., AND REHM, B.H. (2010) Membrane topology of outer membrane protein AlgE, which is required for alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 1806–1812.

HENRIKSSON E, KJELLÉN E, WAHLBERG P, WENNERBERG J, KJELLSTROM JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2006; 42: 320-323.

HERMES, R.S.; NARAYANI, R. Polymeric alginate films and alginate beads for the controlled delivery of macromolecules. **Trends Biomater. Artif. Organs.** 15(2): 54-56, 2002.

HIQASHI OKAI, K., OTANI, S., & OKAI, Y. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. **Cancer Letters**, 140, 21–25, 1999.

HOUGHTON P, FANG R, TECHATANAWAT I, STEVENTON G, HYLANDS PJ, LEE CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods.* 2007; 42 (4): 377-387.

IKEDA, A., TAKEMURA, A., & ONO, H. (2000). Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, 42, 421–425.

INCA. Instituto Nacional de Câncer.[Acesso em Janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>

ISHIKAWA, C.; TAFUKU, S.; KADEKARU, T.; SAWADA, S.; TOMITA, M.; OKUDAIRA, T.; NAKAZATO, T.; TODA, T.; UCHIHARA, J.N.; TAIRA, N.; OHSHIRO, K.; YASUMOTO, T.; MORI, N.; Antiadult T-cell leukemia effects of Brown algae fucoxanthin and its deacetylated product fucoxanthinol. **Int. J. câncer.** 123, 2702-2712, 2008.

ITO, N., FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, an other antioxidants. **Critical reviews in Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 109-150, 1985.

KANETO, H. ET et al., Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabets and atherosclerosis. **Mediators of Inflammation**, p. 1-11, 2010.

KARMAKAR S, BANIK NL, PATEL SJ, RAY SK. Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Neurosci Lett.* 2006;407:53–58.

KASTING, J. F. 1993. Earth's early atmosphere. ***Science***, 259: 920 - 926.

KAUR, I. P., GEETHA, T. 2006. Screening methods for antioxidants-a review. *Mini Rev Med Chem* 6: 305-312.

KAWAGUTI, H. Y. & SATO, H. H. *Quim. Nova.* 2008, 31, 134.

KEHRER, J. P., 2000. Reductive stress. In: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of stress*, v. 3 Academic. Press, San Diego, CA, pp. 327-333.

KHODAGHOLI, F.; EFTEKHARZADEH, B.; YAZDANPARAST, R. – A new artificial chaperone for protein refolding: Sequential use of detergent and alginate. ***Protein journal***, v. 27, p. 123-129, 2008

KILIN, H. *Biochemistry of sea.* ***Z. physiol. chem.*** V. 83, p. 171-197, 1913.

KILIN, H. *Biochemistry of sea.* ***Z. physiol. chem.*** V. 94, p. 337-425, 1915.

KIM, S., & WIJESSEKARA, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. ***Journal of Functional Foods***, 2, 1–9.

KLOAREG, B., MABEAU S, BLAIN C. 1986. Proceedings of the IVth International Meeting 'Cell Walls 1986': 300–303.

KLOAREG, B. & QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. ***Oceanography and Marine Biology: An Annual Review***, 26 (1998), pp. 259–315.

KOVATCHEVA, E. G. et al., Antioxidant activity of extracts from *lavandula vera* MM cell culture. ***Food chemistry***, v. 7, p. 1069-1077, 2011.

KUMAR, M. N. V.. A review of chitin and alginate application. ***Reactive and Functional Polymers***, v.46, p.1-27, 2000.

LAGUERRE, M.; LECANTE, J. e VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing, methods, new trends and challenges. ***Prog. Lip. Res.*** v. 46(5), p. 244-282, set, 2007.

LAMOUREUX, J. V. F. Essai sur les genres de la famille des thalassiphytes non articulés. *Ann. Mus. Hist. Nat. Paris* 20:21-47, 115-39, 267-93, 1813.

LEAL, D. et al., FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research* vol 343, p. 308–316, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L.F.; CHAVANTE, S. F.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. - Structure of a new fucan from the algae *Spatoglossum schröderi*. **Plant Science**, **132**: 215-228, 1998.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chem.** v. 100, p. 237-240, 2007.

LEONARD, M.; RASTELLO DE BOISSESON, M.; HUBERT, P.; DALENÇON, F.; DELLACHERIE, E. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *J. Control. Release*, Amsterdam, v.98, p. 395-405, 2004. LI, B. LU, F., WEI, X.; ZHAO, R. Fucoidan: Structure and bioactivity. **Molecules**, **13**, 1671-1695, 2008.

LIEW, C. V., CHAN, L. W., CHING, L. A., HENG, P. W. S., Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 309, p. 25-37, 2006.

LIN, T.Y. & HASSID, W. Z. (1966a) Isolation of guanosine diphosphate uronic acids from a marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. **Journal of Biological Chemistry** **241**, 3282-3293.

LIN, T. Y. & HASSID, W. Z. (1966b). Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. **Journal of Biological Chemistry** **241**, 5284-5297.

MACDOWELL, R. H., New developments in the chemistry of alginates and their use in food., **Chem. Ind.**, n.9, p. 391-395, 1975 .

MARQUES, C. T. Atividade antitumoral de uma heterofucana da alga marrom *Padina gymnospora*. Dissertação de Mestrado. UFRN – Natal, 2007.

MATHLOUTHI, M.; KOENIG, J. L. Adv. **Carbohydr. Chem. Biochem.** 1986, **44**, 7–66.

MATIAS, W. G. Algas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n.8, p.16-17, 1999.

MATSUKAWA, R. et al., A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 2935, 1997.

MCHUGH, D.J. (1987). Production, properties and uses of alginates, in: production and utilization of products from commercial seaweeds, FAO Fisheries Technical Paper No. 288 (Mchugh, D. J. ed.) Rome: FAO, 58-115.

MEHDI ALBOOFETILEH, MASOUD REZAEI, HEDAYAT HOSSEINI, MEHDI ABDOLLAHI. Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. **Food Control** n.36 p. 1-7, 2014.

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

MILLAS, M.; RINAUDO, M. Polieletrólitos. Instituto de Física e Química de São Paulo – USP, São Carlos, p. 83, 1991.

MO, S. J., SON, E. W., RHEE, D. K., & PYO, K. Modulation of TNF- α -induced ICAM-1 expression, NO and H₂O₂ production by alginate, allicin and ascorbic acid in human endothelial cells. **Archives of Pharmacological Research**, v.26, p.244-251 2003.

MOE, S.T. et. al. Alginates. In: STEPHEN (Ed.). **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 245-286.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Met.** , 65, 55–63, 1983.

MURAVCHICK, S., LEVY, R.J. Clincial implicatios of mitochondrial dysfunction. **Anesthesiology**, v. 105, p. 819-837., 2006.

NAGUNO, T.; NISHIMO, T. – Fucan sulfates and their anticoagulante activities. In: Dumitri s., **Polysaccharides in Medicinal Applications**. New York/Basel: Marcel Dekker. P. 545-574, 1996

NAVARRO, R.F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul, 1997, p. 9-11, 141-144.

NEISER, S.; DRAGET, K.I.; SMIDSDORT, O. Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems. *Food Hydrocol.*, Oxford, v.13, p. 445-458, 1999. NEWTON, D. J., SCOTT, J. E., WHITEMAN, P. The estimation of acid glycosaminoglycan-alcian blue complexes eluted from electrophoretic strips. **Anal Biochem.**, 62, 268-273, 1974.

NUSSINOVITCH, A. Em Hydrocolloid Applications: gum technology in the food and other industries; Nussinovitch, A., eds.; **Blackie Academic & Professional**: London, 1997.

O’SULLIVAN, L. et al. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. **Marine drugs**, [S.1.], v. 8, p. 2038-2064, 2010.

OKAI, Y., & HIQASHI OKAI, K. (1997). Potent anti-inflammatory activity of pheophytin a derived from edible green alga, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori). *International Journal of Immunopharmacology*, 19, 355–358.

OLIVEIRA FILHO, E.C. *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. pp. [i-iv], [1]-407. São Paulo, Brasil: Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. 1977.

OLIVEIRA FILHO, E. C., QUÉJE, N. O gênero *Laminaria* (Phaeophyta) no Brasil, ocorrência e potencialidade econômica. São Paulo, SP: Inst. Pesq. Tecnológicas. 1978 (Pesquisa & Desenvolvimento, 1).

OOI, V. E. C., & LIU, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, 7, 715-729.

PÁDUA, M.; FONTOURA, P. S. G.; MATHIAS, A. L. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Dalile). **Brazilian Archives of Biology and technology**, v.47, n.1, p. 49-55, 2004.

PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 249, p. 139-147, 2002.

PEPPAS, N.A.; BURI, P.A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymers bioadhesion on soft tissues. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 2, p. 257-275, 1985.

PERCIVAL, E., MCDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **New York: Academic Press** 219 p., 1967.

PEREIRA, M. S., MULLOY, B., MOURÃO, P.A.S., Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. *The journal of Biological Chemistry*, v.274, n. 12, issue of march 19, p. 7656-7667, 1999.

PINDAR, D. & BUCKE, C. (1975). The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry Journal*, 152, 617-622.

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 E1. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.

QI, H., ZHANG, Q., ZHAO, T., CHEN, R., ZHANG, H., NIU, X., LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 195–199, 2005.

QIAO, M. et al. Thiol oxidative stress induced by metabolic disorders amplifies macrophage chemotactic responses and accelerates atherogenesis and kidney injury in *Idl* receptor-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc. Biol.** V. 29, p. 1779-1786, 2009.

RAMIREZ-MARES MV, CHANDRA S, DE MEJIA EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguayensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res.* 2004; 554: 53-65.

RANG HP, RITTER JM, DALE MM. In: *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

RAVEN P. H, EVERT R. F & EICHHORN S. E. **Biologia Vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.

REAKA-KUDLA, M. L. 1997. The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forest. In Reaka-Kudla, M. L.; Wilson, D. E. & Wilson, E. O. (eds.), *Biodiversity II*. Joseph Henry Press. Washington, D.C., USA.p. 83 – 108.

REHM N, BUCHINGER S, STROSSER J, DOTZAUER A, WALTER B, HANS S, "BATHE B, SCHOMBURG D, KRAMER R & BURKOVSKI A (2010) Impact of adenyltransferase GlnE on nitrogen starvation response in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* 145: 244–252.

REVIERS, B., Natureza e posição das "algas" na árvore filogenética do mundo vivo. Em: FRANCESCHINI, I. M., BURLIGA, A. L., REVIERS, B., PRADO, J. F., RÉZIG, S. H. *Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Porto Alegre: ARTMED, 2010.

REZAIL, N., & KHODAGHOLI, F. Evaluation of chaperone-like activity of alginate: Microcapsule and water-soluble forms. **Protein Journal**, v.28, p.124-130, (2009).

REZENDE, R. A., BÁRTOLO, P. J., MENDES, A., FILHO, R. M. Análise do comportamento mecânico do alginato como biomaterial para a fabricação de *Scaffolds* na engenharia de tecidos. 2007

ROCHA, F. B. et al., Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Brazilian Journal of Farmacognosy**, v. 17, n.4 p. 631-639, 2007.

ROCHA, H. A. O. et al. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. [S.1.], v. 34, p.621-626, 2001.

ROCHA, H. A. O. et al. Structural and hemostatic activities of a sulfate galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schoederi*. An ideal antithrombotic agent? **Journal of Biological Chemistry**, [S.1.], v. 280, p.41278-41288, 2005a.

ROCHA, H. A. O. et al. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schoederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparin sulfate from endothelial. **Planta Medica**. [S.1.], v.71, n.4, p. 379-381, 2005b.

ROGER, A.J., SIMPSON, A.G.B. Evolution: re-creating the root of the eukaryote tree. **Current Biology**, [S.1.], v. 19, n. 4, p. 165-167, 2009.

RUBERTO, G., Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystiseura* in a micellar model system. **Journal of applied Phycology**, v. 13, p. 403-407, 2001.

RUPÉREZ, P; AHRAZEM, O.; LEAL, J. A. – Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible maine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **J Agric. Food Chem.** 50(4): 840-845, 2002.

SABRA W.; ZENG A.P.; DECKWER W.D. (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56:315–325.

SAKAI, S.; HASHIMOTO, I.; KAWAKAMI, K. Development of alginate-agarose subsieve-size capsules for subsequent modification with a polyelectrolyte complex membrane. *Bioch. Engineering J.*, Amsterdam, v. 30, p. 76-81, 2006. SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**. Fundamentos Teóricos e Práticos. São Paulo: Artliber. 2006.

SALTARELLI, R., CECCAROLI, P., LOTTI, M., ZAMBONELLI, A., BUFFALINI, M., CASADEI, L., VALLORANI, L., STOCCHI, V. Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. **Food Chemistry**, v. 116, p. 143–151, 2009.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydr. Polym.*, Barking, v.66, p. 1-7, 2006.

SCHOTT, H. Reologia. In: GENARO, A. R. Remingtons: Farmacia. Buenos Aires: Ed. Med.Panamericana. p. 461-481, 1992

SCHULTZ, A. – **Introdução a Botânica Sistemática**. Porto Seguro: Edições Ugrs. V. 1, 1980.

SHILPA, A., AGRAWAL, S.S., RAY, A.R., Controlled delivery of drugs from alginate matrix, **J. Macromol. Sci. Polym. Rev.**, v.43, p. 187–221, 2003.

Sieber OM, Heinimann K, Tomlinson IPM. Genomic instability – the engine of tumorigenesis. *Nature Rev.* 2003; 3:701-708.

SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.J.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v. 29, p. 148-159, 2006.

SIMPSON, A. G. B.; ROGER, A. J. The real “kingdoms” of eukaryotes. **Current Biology**, [S.1.], v.14, n. 17, p. 693-696, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; CLAYTON BASSIER, G.; MORRILL, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; Wiley: New York, 1991

SINHA, S., ASTANI, A., GHOSH, T., SCHNITZLER, P., RAY, B. Polysaccharides from *Sargassum tenerrium*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. **Phytochemistry**. 71, 235-242, 2010.

SKJDAK-BRAEK, G.; LARSEN B.; GRASDALEN H. (1986) Monomer sequence and acetylation patter in some bacterial alginates, **Carbohydr. Res.** 154, 239-250.

SMIDSROD, O.; SKJAOK-Br, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotech.**, Amsterdam, v. 8, p.71-78, 1990.

SMIDSROD, O. (1973) Some physical properties of alginates in solution and in the gel state, Thesis, Norwegian Institue of Technology, Trondheim.

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

SO, M.J., KIM, B.K., CHOI,M.J., PARK, K.Y.,RHEE, S.H. AND CHO, E.J. 2007. Protective activity of fucoidan and alginic acid against free radical-induced oxidative stress under in vitro and cellular system. *Journal of Food Science and Nutrition*, 12 (4), 191-196.

SOUZA, A.P.A.; TORRES, M.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ROCHA FILHO, F.D; ALVES, A.P.N.N.; COSTA-LATOUFO, L.V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 tumor by alginates from the brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Carbohydr. Pol.** 69: 7-13, 2007.

SPECTOR, J. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50µg of protein. **Anal. Biochem.** v. 86, p.142-143, 1978.

SPIZZIRRI U. G., PARISI, O.I.; IEMMA, F.; CIRILLO, G.; PUOCI, F.; CURCIO, M.; PICCI, N. Antioxidant–polysaccharide conjugates for food application by eco-friendly grafting procedure. **Carbohydrate Polymers** 79 (2010) 333–340.

STABLER, C. WILKS, K. SAMBANIS, A., CONSTANTINIDIS I (2001) The effects of alginate composition on encapsulated BTC3 cells, **Biomaterials** 22: 1301-1310.

STANDFORD, E. C. C. (1881), british patent 142.

STENECK, R.S. & V. TESTA 1997. Are calcareous algae important to reefs today or in the past? Proc. 8th Int. Coral Reef. Sym., 1: 685-688.

SUN, H. H., MAO, W. J., CHEN, Y., GUO, S. D., LI, H. Y., QI, X. H., CHEN, Y. L., XU, J. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 117–124, 2009.

- TANNIN-SPITZ, T., BERGMAN, M., VAN-MOPPES, D., GROSSMAN, S., ARAD, S. M. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, p. 215–222, 2005.
- TREVELYAN, W. E., PROCTER, D. P. & HARRISON, J. S. Detection of sugar on paper chromatograms. **Nature**, 166, 444-445, 1950.
- TSUNDA, T., K. KALBUCHI, Y. KAWAHARA, H. FUKUZAKI, AND Y. TAKAI. 1985. Induction of protein kinase C and calcium ion mobilization by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 cells. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 187:43-46. TUL'CHINSKY, V. M.; ZURABYAN, Z. E.; ASANKOSHOEV, K. A.; KOGAN, G. A.; KHORLIN, A. Y. **Carbohydr. Res.** 1976, 51, 1–8
- UEDA, J.-I., SAITO, N., SHIMAZU, Y., OZAWA, T. A Comparison of Scavenging Abilities of Antioxidants against Hydroxyl Radicals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, p, 377–384, 1996.
- VALKO, M. et al., Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interaction**. v. 160, p. 1-40, 2006.
- VALKO, M. et al., Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biological**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v.27, n.1 p.139-145, 2004.
- WALKER, D.I. & G.A. KENDRICK 1998. Threats to macroalgal diversity: Marine habitat destruction and fragmentation, pollution and introduced species. *Bot. Mar.*,41: 105-112.
- WALTER, R.H. Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food. San Diego : Academic Press, 1998
- WANG J.; ZHANG Z.; LI Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fraction extracted from *Laminaria japonica*. **International of Biologica Macromolecules**, v.42, p.127-132, 2008.
- WANG, J., PAN, C.J., HUANG, N., SUN H., YANG P., LENG, Y.X., CHEN, J.Y., WAN, G.J. AND CHU, P.K., Surface characterization and blood compatibility poly(ethylene terephthalate) modified by plasma surface grafting. **Surface & Coatings Technology**, 196 (2005), pp. 307–311.
- WEI WANG, XIAO-JUN HUANG, JIAN-DA CAO, PING LAN, WEN WU. Immobilization of sodium alginate sulfates on polysulfone ultrafiltration membranes for selective adsorption of low-density lipoprotein. **Acta Biomaterialia**. n. 10. p. 234-243, 2014.
- WELCH KD, DAVIS TZ, VAN EDEN ME, AUST SD. **Deleterious ironmediated oxidation of biomolecules**. *Free Radical Biol. Med*; 32 : 577-83, 2002.

WENG, X.C.; WANG, W. Antioxidante activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. *Food Chemistry*, v. 71, p. 489-493, 2000

WICKENS, A. P. ageing and the free radical theory. **Respiratory physiology**, [S.1], v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

WOLF, S. P. **Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurment of hydroperoxides**. In: Packer L (ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., p. 182–189, 1994.

YANG, J. W. et al. – Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, V. 346, p. 345-350, 2006.

YANG, R., XU, J.J., OZAYDIN-INCE, G., WONG, S.Y. AND GLEASON, K.K., Surface-tethered zwitterionic ultrathin antifouling coatings on reverse osmosis membranes by initiated chemical vapor deposition. **Chemistry of Materials**, 23 (2011), pp. 1263–1272

YEN G.-C., CHEN H.-Y. (1995): Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agr. Food Chem.*, 43: 27–32.

YUAN, Y. V., CARRINGTON, M. F., WALSH, N. A. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 1073–1081, 2005.

ZHAO, X., XUE, C., LI, B. Study of antioxidante activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. **Journal of Applied Phycology**, [S.1.], v. 20, n. 4, p. 431-436, 2007.

ZHOU, Y.C.; ZHENG, R. L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem. Pharmacol.*, v.42, n.6, p.1177–1185, 1991.

ZOU, C., DU, Y., LI, Y., YANG, J., FENG, T., ZHANG, L., & KENNEDY, J. F. Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 322–331, 2008.

ZUBIA, M.; PAYRI, C.; DESLANDES, E. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia) **J Appl Phycol** (2008) 20:1033–1043.

