



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Cauê Gion de Medeiros

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
DE *Gracilaria birdiae*
E CARACTERIZAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**Natal - RN
2015**

Cauê Gion de Medeiros

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
DE *Gracilaria birdiae*
E CARACTERIZAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha

Natal - RN

2015

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Medeiros, Cauê Gion de.

Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria birdiae* e caracterização de sua atividade antioxidante / Cauê Gion de Medeiros. – Natal, RN, 2015.

56 f.: il.

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

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Curso de Ciências Biológicas.

1. Alga Vermelha. – Monografia. 2. Polissacarídeos sulfatados. – Monografia. 3. Atividade antioxidante. – Monografia. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 582.273

Cauê Gion de Medeiros

**SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
A PARTIR DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
DE *Gracilaria birdiae*
E CARACTERIZAÇÃO DA SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em 06 de outubro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



**Professor Doutor
Hugo Alexandre de Oliveira Rocha**
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(UFRN)
Orientador



**Professor Mestre
Pablo de Castro Santos**
Universidade Estadual do Rio Grande do Norte
(UERN)
Examinador Externo



**Doutora
Monique Gabriela das Chagas Faustino Alves**
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(UFRN)
Examinadora Interna

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTE TRABALHO A DEUS;

Aos meus pais: Marcos e Josione;

A minha mãe de criação e seu marido: Elione e tio Honório;

Aos meus irmãos e irmãs: Cainã, Davi, Sara e Sulamita;

Aos meus amigos e membros da igreja;

Meu Pastor e sua esposa: Luciano Sales e Kaliny Sales;

Meus irmãos da música: Matthaeus, Rufino, Dalmo e Ailton;

Aos amigos e professores de Ciências Biológicas;

A toda a equipe da CAENE;

As professoras: Luciana da Matta, Renata Swany,

Marta Costa, Ivaneide Soares e Renata Panosso;

*E muito especialmente ao professor Hugo Rocha
e aos meus amigos do BIOBOL.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram me orientando, ajudando e aconselhando:

EQUIPE DA CAENE:

*Prof. Ricardo, Socorro, Érika Luzia, Daniellê, Lílian Barbosa (tutora)
e Eliana Rodrigues.*

ALUNOS E PROFESSORES DO BIOPOL:

*Prof. Hugo, Rony Lucas, Maxssuel, Almino, Jailma, Vinicius, Gabriel, Marília,
Mônica, Pablo, Poliana e a todos os amigos do laboratório.*

COORDENADORAS DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Prof.^a Luciana da Matta (ex-coordenadora) e Prof.^a Renata Swany.

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Prof. Graco Aurélio.

EQUIPE DO C.T.A. (EXTREMOZ):

*Jóilson, Adonias, Fernando, Sérgio, Fabiane, Anchieta, Naira, Maria,
Lizandra e Beethoven.*

ALUNOS E PROFESSORES DO LAMAQ:

*Pryscila Cinara, Jorge, Mahara, Duane, Prof.^a Ivaneide, Prof.^a Renata Panasso,
Edson e Alí Gerger.*

ALUNOS E PROFESSORES DO CURSO DE QUÍMICA:

Prof.^a Marta Costa, Prof.^a Fátima, Susan Medeiros, Vitor Reis.

**A TODOS OS MEUS AMIGOS E COLEGAS
DA TURMA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (2010.1) !!!**

EPÍGRAFE

*“Confia no Senhor de todo o teu coração
e não te apoies em teu próprio entendimento;
Reconhece o Senhor em todos os teus caminhos,
e ele endireitará tuas veredas.”*

Salomão (Provérbios 3 : 5-6)

RESUMO

Polissacarídeos sulfatados (PSs) da alga vermelha comestível *Gracilaria birdiae* possuem atividade antioxidante. Trabalhos anteriores mostram esses PSs, quando em forma de nanopartículas de prata (NpsAg), apresentam melhor atividade antioxidante do que em sua forma original. Contudo, não há dados referentes a NpsAg sintetizadas com PSs de *G. birdiae*. Portanto, NpsAg sintetizadas a partir dos PSs de *G. birdiae* foram obtidas e avaliadas como agentes antioxidantes. Para tal, as algas foram coletadas, congeladas, limpas, secas, trituradas, pesadas, delipidadas, proteolisadas e centrifugadas. O sobrenadante resultante, que continha os PSs, foi misturado com metanol para promover a precipitação dos PSs. Após 24 h, estes foram separados da solução por centrifugação, foram secos, solubilizados em água destilada e colocados para reagir com nitrato de prata por 24 h, sob agitação. Foram realizadas a detecção e a medição de tamanho das NpsAg por dispersão de luz dinâmica (DLS). O extrato de PS foi avaliado quanto a sua capacidade redutora pelo teste de capacidade antioxidante total (CAT). A capacidade antioxidante das NpsAg e dos PS também foi determinada pelo teste de quelação férrica. O teor de proteínas e de açúcar foi determinado por espectrofotometria. Os PS apresentaram CAT, e isso habilitou-os para a síntese de NpsAg. As NpsAg apresentaram tamanho médio de 117,6 nm. Nenhuma contaminação proteica foi encontrada nos PSs e nas NpsAg. O teor de açúcar na suspensão de NpsAg (55,7%) foi superior ao encontrado na solução de PSs (49,7%). A suspensão com NpsAg apresentou uma atividade quelante de ferro 25% maior que a solução de PSs. Os resultados mostraram que os PSs de *G. birdiae*, sob a forma de nanopartículas, tiveram a sua atividade quelante de ferro potencializada, indicando que as nanopartículas de prata podem ser objeto de futuros estudos para identificar seu potencial como agentes antioxidantes em diferentes aplicações.

Palavras chaves: Alga vermelha. Nanopartículas metálicas. Síntese. Quelação férrica.

ABSTRACT

Sulfated polysaccharides (SPs) from the edible red algae *Gracilaria birdiae* have antioxidant activity. Previous study have shown that these SPs, when in the form of silver nanoparticles (AgNps), showed better antioxidant activity than in its original form. However, there is no data about AgNps synthesized with the SPs from *G. birdiae*. Then, AgNps synthesized with the SPs from *G. birdiae* were obtained and evaluated as antioxidant agents. For this, the seaweed were collected, frozen, cleaned, dried, crushed, weighed, defatted and dried again. After that, they were proteolysed and centrifuged. The resulting supernatant was mixed with methanol to promote the polysaccharides (PS) precipitation. After 24 h, these PS were separated from the solution by centrifugation, dried, solubilized in distilled water and placed to react with silver nitrate per 24 h, under stirring. The AgNps detection and size measurement were made by dynamic light scattering (DLS). The PS reducing capacity was evaluated by the total antioxidant capacity test (TAC). The antioxidant capacity of AgNps and SPs was also determined by ferric chelation test. In addition, their protein and sugar content were determined spectrophotometrically. The PS showed TAC, and this allowed the synthesis of AgNps. The AgNps showed an average size of 117.6 nm. No protein contamination was found in the SPs neither AgNps. The sugar content in the AgNps suspension was higher (55.7%) than that found in the SPs solution (49.7%). The AgNps suspension presented an iron chelating activity 25% higher than the of SPs solution. The results showed that the SPs of *G. birdiae*, in the form nanoparticles, had their iron chelating activity enhanced, indicating that the silver nanoparticles can be subject of further studies to identify their potential as antioxidants agents in different applications.

Keywords: Red algae. Metallic nanoparticles. Synthesis. Ferric chelation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	
⇒ Cultivo (A), colheita (B) e processamento (C) de <i>Gracilaria birdiae</i> .	
.....	16
Figura 2	
⇒ Agarose e os constituintes do ágar.	
.....	17
Figura 3	
⇒ Unidades sulfatadas de D-galactose, anidrogalactose e principais tipos de carragenanas.	
.....	19
Figura 4	
⇒ Desordens relacionadas aos radicais livres.	
.....	21
Figura 5	
⇒ Redução tetravalente do oxigênio na mitocôndria até a formação de água.	
.....	23
Figura 6	
⇒ Formação de hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio.	
.....	25
Figura 7	
⇒ Capacidade antioxidante total de PS de algas marinhas presentes no litoral potiguar.	
.....	28
Figura 8	
⇒ Alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i> .	
.....	35
Figura 9	
⇒ Local de coleta.	
.....	35
Figura 10	
⇒ Teor de polissacarídeos das amostras.	
.....	42
Figura 11	
⇒ Atividade quelante de ferro das amostras.	
.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1

⇒ Estruturas dissacarídicas das carragenanas de rodofíceas.

.....18

Tabela 2

⇒ Atividades diversas de rodofíceas brasileiras.

.....19

Tabela 3

⇒ Atividades antibióticas e biológicas de rodofíceas brasileiras.

.....26

Tabela 4

⇒ Variedade das atividades antioxidantes de diversas rodofíceas.

.....29

Tabela 5

⇒ Diâmetro e atividades biológicas de NpsAg sintetizadas a partir de algas marinhas.

.....33

Tabela 6

⇒ Classificação do material biológico utilizado.

.....35

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

% ⇒ Por cento.

≈ ⇒ Aproximadamente

® ⇒ Marca registrada.

μg ⇒ Micrograma.

μL ⇒ Microlitro.

AgNps ⇒ Silver nanoparticles.

CAT ⇒ Capacidade antioxidante total.

EBP ⇒ Extrato bruto de polissacarídeos.

EDTA ⇒ Ácido etilenodiamino tetracético.

ERN ⇒ Espécies reativas de nitrogênio.

ERO ⇒ Espécies reativas de oxigênio.

FeCl₂ ⇒ Cloreto férrico.

g ⇒ Força gravitacional da Terra.

M ⇒ Molar.

mg ⇒ Miligrama.

mg/mL ⇒ Miligrama por mililitro.

mL ⇒ Mililitro.

mM ⇒ Milimolar.

Mo ⇒ Molibdênio.

NaCl ⇒ Cloreto de sódio.

nm ⇒ Nanômetros

Nps ⇒ Nanopartículas.

NpsAg ⇒ Nanopartículas de prata.

PS ⇒ Polissacarídeos / Polysaccharides.

SPs ⇒ Sulfated polysaccharides.

PSs ⇒ Polissacarídeos sulfatados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Divisão Rhodophyceae	14
1.2 Cultivo de <i>Gracilaria</i> no litoral potiguar	14
1.3 Polissacarídeos sulfatados de rodofíceas	17
1.3.1 Aplicações de agaroses e carragenanas	20
1.4 Atividade antioxidante	21
1.4.1 Radicais livres	21
1.4.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)	22
1.4.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO)	22
1.4.4 As principais ERO	23
1.4.5 O íon de ferro e a formação de ERO	25
1.4.6 Sistema de defesa antioxidante	26
1.4.7 Antioxidantes biológicos e sintéticos	27
1.4.8 Polissacarídeos sulfatados antioxidantes de rodofíceas	28
1.5 Nanopartículas	29
1.5.1 Nanopartículas de prata (NpsAg): uma visão geral	30
1.5.2 Síntese de nanopartículas de prata	31
1.5.3 Aplicações biomédicas de nanopartículas	32
1.5.4 Síntese de NpsAg a partir de algas marinhas e suas atividades biológicas	32
2. OBJETIVOS	34
2.2 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Materiais	35
3.1.1 Material biológico	35
3.2 Outros materiais	36
3.2.1 Reagentes	36
3.2.2 Equipamentos	36
3.3 Métodos	37
3.3.1 Extração de polissacarídeos da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	37
3.3.1.1 Coleta, limpeza e congelamento	37
3.3.1.2 Descongelamento, enxágue da amostra e limpeza	37

3.3.1.3 Secagem em estufa, trituração e pesagem	37
3.3.1.4 Delipidação, descarte de etanol e secagem	37
3.3.1.5 Proteólise, peneiração, descarte da amostra e centrifugação	38
3.3.1.6 Precipitação de polissacarídeos	38
3.3.1.7 Centrifugação, dessecação a vácuo, pesagem e armazenamento	39
3.3.2 Síntese de Nanopartículas de prata	39
3.3.2.1 Detecção e medição das NpsAg por dispersão de luz dinâmica (DLS)	39
3.3.3 Atividade antioxidante de polissacarídeos e nanopartículas	39
3.3.3.1 Capacidade antioxidante total (CAT) dos PSs	39
3.3.3.2 Quelação de íons de ferro	40
3.3.4 Caracterização química de polissacarídeos e nanopartículas	40
3.3.4.1 Dosagem de proteínas totais	40
3.3.4.2 Dosagem de açúcares totais	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Obtenção de PSs de <i>Gracilaria birdiae</i>	41
4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) dos PSs	41
4.3 Síntese de nanopartículas de prata (NpsAg) a partir de PSs	41
4.4 Dosagem de açúcares totais presentes em PSs e em NpsAg	41
4.5 Dosagem de proteínas totais presentes em PSs e em NpsAg	42
4.6 Avaliação da capacidade quelante de íons de ferro	42
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Divisão Rhodophyceae

As rodofíceas compreendem cerca de 2500 a 6000 espécies, distribuídas em cerca de 670 gêneros (WOELKERLING, 1990). Se desconsiderarmos os sinônimos, o número real deve situar-se entre 4.000 e 6.000 espécies (LOURENÇO, 2006).

A maioria das espécies é macroscópica e ocorre principalmente em águas tropicais e temperadas-quentes, ao passo que as espécies unicelulares estão em menor número. Nos habitats de água doce são reconhecidos cerca de 20 gêneros que contém cerca de 150 espécies (LOURENÇO, 2006).

Essas algas apresentam clorofilas “a” (ADL *et al.*, 2012) e “d” (em certos grupos); ausência de flagelos e centríolos; amido das florídeas como produto de reserva; armazenamento de amido no citoplasma; utilização de ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina como pigmentos acessórios; tilacóides desempilhados dentro dos plastídios; ausência de retículo endoplasmático nos cloroplastos (FRESHWATER, 2000).

A absorção de luz azul por seus pigmentos vermelhos permite que algumas espécies cresçam em profundidades de 268 metros, onde a quantidade de luz disponível pode ser tão pequena quanto 0,0005% de luz solar (LITTLER *et al.*, 1985). Por isso, certas espécies de algas vermelhas são capazes de viver em ambientes mais profundos do que outros seres fotossintéticos (WISE, 2007). Como não há consenso na classificação das rodofíceas, escolheu-se o sistema sugerido por Adl e colaboradores em 2012, no qual as algas vermelhas são chamadas de “Rhodophyceae” (rodofíceas) e fazem parte do super-grupo “Archaeplastida”.

1.2 Cultivo de *Gracilaria* no litoral potiguar

Países como China, Japão e Coréia do Sul consomem algas diariamente (BEZERRA e MARINHO-SORIANO, 2010). Além de servirem como alimento, certas algas do gênero *Gracilaria* também são cultivadas para extração de hidrocolóides e de compostos bioativos. O gênero *Gracilaria* é o preferido para se extrair ágar com grau alimentício, enquanto que o gênero *Gelidium* é o preferido para se obter ágar e agarose com grau bacteriológico e farmacêutico (BIXLER e PORSE, 2011).

No Brasil, a exploração de algas vermelhas começou nos anos 60, sem nenhuma regulamentação, ao longo do litoral nordestino (REBOURS *et al.*, 2014). Comunidades pesqueiras do Nordeste há muito tempo colhem espécimes do gênero *Gracilaria* para alimentação humana e extração de ágar.

Entre os anos 70 e 80, a demanda por ágar e outros derivados causou super-exploração e diminuição dos recursos naturais. Por isso, cultivos experimentais foram implantados junto às comunidades pesqueiras, para preservar os bancos de algas e promover o desenvolvimento socioeconômico (BEZERRA, 2008).

Vários estudos foram desenvolvidos (LIMA *et al.*, 1981; CÂMARA-NETO, 1987; OLIVEIRA, 1997; MARINHO-SORIANO *et al.*, 2002, 2005, 2006) e entre 2001 e 2003, um projeto financiado pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) mostrou viabilidade para o cultivo de *Gracilaria* nas comunidades pesqueiras do Rio Grande do Norte, da Paraíba e do Ceará (REBOURS *et al.*, 2014).

Nessas comunidades, a colheita de algas é uma atividade secundária, para complementar a renda da pesca, e portanto não costuma ser feita pelos chefes de família (os pescadores), mas sim pelas mulheres (REBOURS *et al.*, 2014).

Na figura 1 vemos a colheita e o cultivo de *G. birdiae* feitos pela AMAR (Associação das Maricultoras de Rio do Fogo - RN), que produz uma biomassa mensal de 0,9 a 3,5 Kg/m² (MARINHO-SORIANO *et al.*, 2006). Na AMAR, as algas são secas, trituradas e depois vendidas como “farinha” para a Sina Flora, indústria de cosméticos e alimentos. Além da “farinha”, a AMAR também vende xampu e sabonete líquido feitos com o material. A AgarGel trabalha com algas há 40 anos e, desde 1993, tem uma fábrica de ágar em João Pessoa (PB). A empresa compra da AMAR as algas *in natura*, por cerca de R\$ 2,00/quilo, e exporta algas secas, ágar-ágar e goma carragenana. Na figura 1 também se mostra algumas etapas do beneficiamento das algas quando as mesmas se encontram na fábrica da AgarGel.

No Rio Grande do Norte, além da comunidade de Rio de Fogo, as comunidades de Pititinga e Barra de Maxaranguape também cultivam *Gracilaria birdiae*. Contudo, o cultivo ainda é incipiente. Mesmo assim, ainda que a maricultura potiguar seja uma atividade recente, continua sendo oportuna para melhorar a situação das populações costeiras e suas comunidades. Além de gerar conhecimento, também oferece uma fonte de renda para as mulheres e seus filhos. Dessa maneira, a maricultura é uma alternativa viável para reduzir as dificuldades daqueles que obtêm renda dessa atividade extrativista (BEZERRA, 2008).

Figura 1. (A) Colheita, (B) cultivo e (C) processamento de *G. birdiae*

(A) Colheita manual de algas



As algas são colhidas com as mãos, por mulheres e seus filhos.



Quando não há algas na praia, utiliza-se jangadas para ir coletá-las.



As algas colhidas ou cultivadas são guardadas em sacos de nylon.



Depois são colocadas no chão e ficam secando sob a luz do sol, de 2 a 3 dias.



(B) Cultivo de algas em ambiente marinho



Mudas de algas são colocadas dentro de cestas de nylon e levadas ao mar durante a maré baixa, na época de lua minguante.



As cestas de nylon são fixadas em tubos flutuantes. Após 15 dias, retira-se as algas invasoras do cultivo.



Em torno de dois meses, as algas já podem ser colhidas.



(C) processamento

A fábrica da AgarGel, em João Pessoa (PB), compra as algas (cada quilo ≈ 2 reais) para produzir ágar-ágar.



FONTE: REBOURS *et al.*, 2014; UOL Economia Agronegócio, 2013. Disponível em: <<http://goo.gl/ITN2Rs>>. (acessado em 16/05/15).

IMAGENS: Eliane Marinho Soriano; AgarGel.

1.3 Polissacarídeos sulfatados de rodófitas

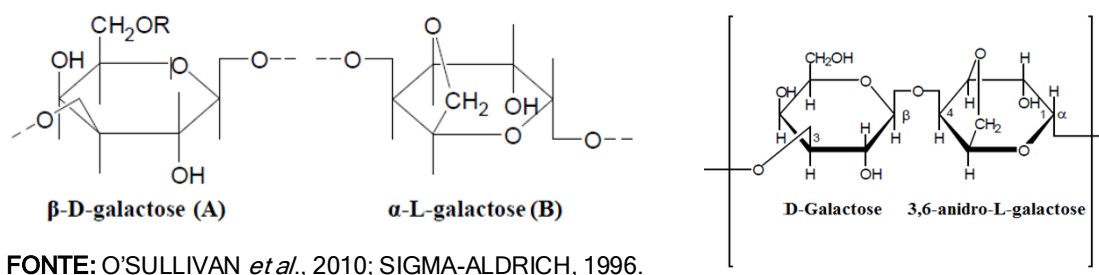
Os polissacarídeos algais são diversos; muitos são metabolicamente ativos, atuando como componentes estruturais da parede celular e também como moléculas de reserva (STENGEL *et al.*, 2011). Os polissacarídeos sulfatados (PSs) se tornaram alvo de pesquisa devido a suas utilidades farmacológicas, biotecnológicas, aplicações alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (CUNHA *et al.*, 2009).

Os PS estão presentes na matriz mucilaginosa das algas. Por serem higroscópicos, supõe-se que, durante a maré baixa, protejam as algas contra a desidratação provocada pelo vento e pelo sol (COSTA *et al.*, 2012). Sua natureza mucilaginosa talvez permita que as algas sejam flexíveis o suficiente para suportarem a ação das ondas e rígidas o suficiente para ficarem estendidas e realizarem fotossíntese. (O'SULLIVAN *et al.*, 2010).

As algas vermelhas (Rhodophyceae) apresentam galactanas sulfatadas (PSs ricos em D-galactose) como polissacarídeos característicos. (SOUZA *et al.*, 2007; ZONG *et al.*, 2012). Nesse grupo encontram-se o ágar (mistura de diversas galactanas), as agaranas e diversos tipos de carragenanas (homogalactanas sulfatadas) (PRESA, 2013). Estudos recentes também relataram a presença de outros tipos de PSs em algas vermelhas, por exemplo, xilomananas em *Scinaia hatei* (MANDAL *et al.*, 2008) e heterofucanas em *Gloiopeltis tenax* (LIM, RYU, 2009).

As agaranas são encontradas nos gêneros *Gracilaria*, *Gelidium* e *Pterocladia*. (CUNHA *et al.*, 2009). Sua estrutura básica (Figura 2) é uma cadeia linear formada por várias unidades dissacarídicas de β -D-galactose 1 \rightarrow 3 ligada e α -L-galactose 1 \rightarrow 4 ligada, arranjadas em unidades repetidas (AB). Essas unidades podem ser substituídas por sulfato em várias posições. Os resíduos de α -L-galactose podem ser substituídos em 3,6-anidro- α -L-galactose por eliminação de grupos sulfato na posição 6. Além dos grupos sulfato, podem ser encontrados piruvato e/ou grupos metil (CH_3) (CUNHA *et al.*, 2009; FIDELIS, 2014).

Figura 2. Agarose e os constituintes do ágar. R = (H ou CH_3).



Carragenanas são PSs lineares constituídos por unidades de β -D-galactose 1 \rightarrow 3 ligada e α -D-galactose 1 \rightarrow 4 ligada, com grupos sulfato em diferentes posições. Em alguns casos, essa unidade de α -D-galactose pode se apresentar na forma de anidrogalactose. As carragenanas diferenciam-se das agaranas por possuírem a unidade B na forma de α -D-galactose. São encontradas nos gêneros *Solieria*, *Eucheuma*, *Meristotheca (Meristiella)* e *Calophucis* (CUNHA *et al.*, 2009). São os principais constituintes da parede celular dessas rodófitas, representando de 30 a 75% do peso seco dessas algas. Na tabela 1 apresenta-se a estrutura das carragenanas.

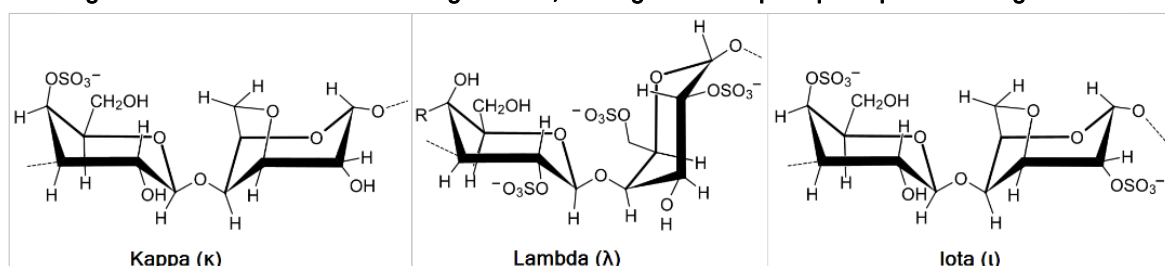
Tabela 1: Estruturas dissacarídicas das carragenanas de rodófitas.

Família	Símbolo grego	1,3-ligado (unidade A)	1,4-ligado (unidade B)
Kappa	kappa (κ)	β -D-galactose 4-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose
	iota (ι)	β -D-galactose 4-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	mu (μ)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 6-sulfato
	nu (ν)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	ômicron (\omicron)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato
Beta	beta (β)	β -D-galactose	3,6-anidro- α -D-galactose
	gama (γ)	β -D-galactose	α -D-galactose 6-sulfato
	ômega (ω)	β -D-galactose 6-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose
	psi (ψ)	β -D-galactose 6-sulfato	α -D-galactose 6-sulfato
Lambda	delta (δ)	β -D-galactose	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	alfa (α)	β -D-galactose	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	lambda (λ)	β -D-galactose 2-sulfato	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	theta (θ)	β -D-galactose 2-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	xi (ξ)	β -D-galactose 2-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato
	pi (π)	β -D-galactose P,2-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato

FONTE: adaptado de LAHAYE, 2001. P \rightarrow piruvato.

Carragenanas kappa (κ) (Figura 3) são formadas por uma β -D-galactose sulfatada em C4, ligada a uma anidrogalactose. Formam géis rígidos na presença de potássio (K^+). Carragenanas iota (ι) são formadas por uma β -D-galactose sulfatada em C4, ligada a uma anidrogalactose sulfatada em C2 (VERA *et al.*, 2011). Formam géis macios e elásticos na presença de cálcio (Ca^{2+}), cuja resistência é dependente da força iônica. Carragenanas lambda (λ) são formadas por uma β -D-galactose sulfatada em C2, ligada a uma α -D-galactose sulfatada em C2 e C6. Suas cadeias estruturais não formam hélices; por isso, são PS não-gelificantes. Sem depender de íons, formam soluções viscosas, usadas como espessantes em alimentos. Por causa dessa capacidade de formar soluções viscosas ou géis, as galactanas sulfatadas de rodófitas são usadas em muitos produtos alimentícios, farmacêuticos e biotecnológicos (CARDOSO 2007).

Figura 3. Unidades sulfatadas de D-galactose, anidrogalaactose e principais tipos de carragenanas.



FONTE: VERA *et al.*, 2011.

As galactanas de rodófitas são usadas como substituintes de amido, de lipídeos (em enlatados e laticínios) e na produção de geleias (FIDELIS, 2014). Além dos alimentos, as rodófitas também apresentam diversos tipos de atividades heterólogas (Tabela 2).

Tabela 2: Atividades diversas de rodófitas brasileiras.

Espécie	Atividade								
	Anti-bacteriana	Antiviral	Anti-fúngica	Anti-coagulante	Anti-oxidante	Anti-inflamatória	Anti-tumoral	Anti-nociceptiva	Cito-tóxica
<i>Acanthophora spicifera</i>	X	X		X	X				X
<i>Bostrychia tenella</i>			X		X				
<i>Callophyllis microdonta</i>					X				
<i>Chondracanthus acicularis</i>	X	X			X				X
<i>Eucheuma cottoni (a)</i>					X				
<i>Eucheuma spinosum (a)</i>					X				
<i>Gelidium crinale</i>				X					
<i>Gelidium coarctatum</i>				X					
<i>Gelidium pussillum</i>				X					
<i>Gracilaria birdiae</i>				X	X	X			
<i>Gracilaria cearensis</i>		X			X				
<i>Gracilaria cervicomis (Gracilaria ferox)</i>				X	X				
<i>Gracilaria debilis</i>	X								
<i>Gracilaria domingensis</i>	X			X	X				X
<i>Gracilaria folifera</i>	X								
<i>Gracilaria omata</i>	X								
<i>Hydropuntia caudata (Gracilaria caudata)</i>					X		X		
<i>Hydropuntia comea (Gracilaria comea)</i>				X		X		X	
<i>Hypnea musciformis</i>	X	X		X	X		X		X
<i>Meristotheca gelidium (Meristiella gelidium)</i>		X		X					
<i>Pterocladia capillacea (Pterocladia capillacea)</i>		X		X	X	X		X	X
<i>Solieria filiformes</i>	X			X		X		X	

(a) espécies não-nativas, cultivadas no Brasil. Os nomes entre parênteses estão desatualizados.

FONTE: adaptado de FERNANDES *et al.*, 2014.

1.3.1 Aplicações de agaroses e carragenanas

Agarose e ágar são usados em meios de separação e purificação (eletroforese em gel, cromatografia de gel-filtração, cromatografia de exclusão por tamanho); produtos de química fina; hormônios, enzimas e vacinas; raios-X com bário; liberação sustentada de fármacos; moldes odontológicos; criminologia; fabricação de corantes, gelatina vegetariana (SAND e GLICKSMAN; SELBY e WYNNE, 1973) e microesferas de gel (YI *et al.*, 2004); filmes e discos; meio de cultura para microrganismos; imobilização de enzimas e células; encapsulamento de bactérias e células (RINAUDO, 2008).

Na indústria de alimentos são preferidos géis macios (ágar com alguns substituintes) enquanto que nas indústrias farmacêutica e microbiológica são preferidos géis mais rígidos (feitos com a melhor agarose) (RINAUDO, 2008).

As carragenanas são usadas como agente espessante; agente estabilizante; solidificação e emulsão de soluções; clarificação de cervejas por precipitação de proteínas (RINAUDO, 2008); encapsulamento de alimentos e suplementos (YI *et al.*, 2004); fabricação de películas de revestimento comestível (KARBOWIAK *et al.*, 2006); liberação sustentada de fármacos (RINAUDO, 2008); fabricação de cosméticos, produtos para banho e suplementos dietéticos (GENNADOIS, 2000).

As carragenanas kappa e iota são usadas na área biomédica, devido a suas propriedades termo-gelificantes (CHIBATA, 1981). Esses PS formam complexos de gel com diferentes polímeros, os quais são usados para encapsular microrganismos e produzir diferentes metabólitos (RINAUDO, 2008).

Os hidrogéis de carragenana imobilizaram a enzima lipase por imobilização covalente ou aprisionamento, aumentando a estabilidade da enzima. A catalase e a β -galactosidase, extraídas de *Aspergillus niger*, também foram imobilizadas, neste caso em um gel misto de alginato/carragenana (RINAUDO, 2008).

Hidrogéis de carragenanas kappa foram usados para encapsular *Escherichia coli* (produção de ácido aspártico); *Lactobacillus* (produção de ácido láctico); *Brevidium flavum* (produção de ácido L-málico) e *Pseudomonas* (produção de L-alanina) (RINAUDO, 2008). Além do encapsulamento, os hidrogéis também já foram usados na bioadesão, para revestir ferimentos da pele humana (SEN e AVCI, 2005).

As carragenanas também são ativas contra o HIV. Testes em camundongos mostraram que oligossacarídeos de carragenanas podem ajustar a função das células T e assim melhorar seu papel no combate do vírus (RINAUDO, 2008).

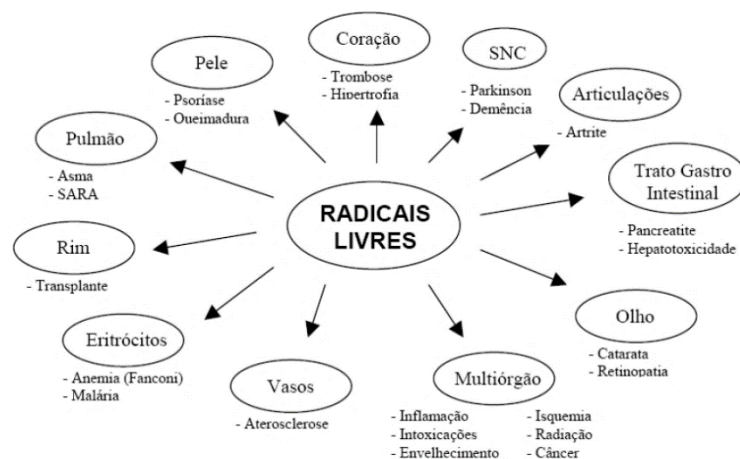
Por último, carragenanas lambda de baixa massa molecular, obtidas por degradação com microondas de carragenanas extraídas de *Chondrus ocellatus*, foram misturadas com 5-Fluoro-uracil (fármaco para tratar câncer) e testadas em células H-22 (carcinoma hepático) transplantadas em camundongos (ZHOU *et al.*, 2006). Assim, o experimento mostrou que a mistura de carragenanas lambda com o fármaco 5-Fu conseguiu renovar significativamente a função imune dos camundongos tratados, que tinham sido prejudicados pelo efeito imunossupressor de 5-Fu.

1.4 Atividade antioxidante

1.4.1 Radicais livres

Seres vivos estão expostos ao estresse oxidativo, condição fisiológica que surge quando moléculas instáveis, intituladas de radicais livres, são produzidas nas reações do metabolismo celular (FIDELIS, 2014). Estes radicais são átomos ou moléculas bastante reativas que possuem número ímpar de elétrons (elétrons desemparelhados) em sua última camada eletrônica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). São capazes de interagir com moléculas do organismo, inibindo ou modificando a função delas (FIDELIS, 2014). Essa interação é prejudicial e causa uma variedade de doenças, desordens e disfunções mostradas na figura 4:

Figura 4. Desordens relacionadas aos radicais livres.



FONTE: COSTA, L. S.; 2008.

Os radicais livres atuam através de reações de oxirredução, podendo ceder o elétron desemparelhado, oxidando-se, ou então receber outro elétron, reduzindo-se (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). São a causa e o resultado dessas reações e, portanto, podem danificar células em razão de sua alta reatividade.

1.4.2 Espécies reativas de nitrogênio (ERN)

Nem todas as espécies reativas têm elétrons desemparelhados ou número ímpar de elétrons na última camada. “Radical livre” é um equívoco; são preferíveis os termos “espécies reativas de oxigênio” (ERO) e “de nitrogênio” (ERN), as quais são representadas por: ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), peroxinitrito (ONOO^-), óxido nitroso (N_2O_3) e óxido nítrico (NO^\bullet) (HALLIWELL *et al.*, 2006).

1.4.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

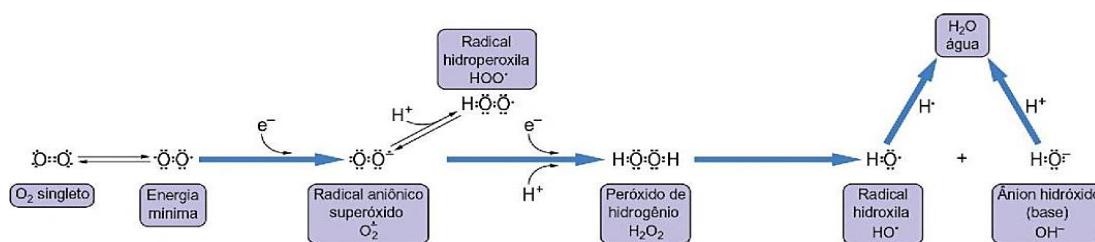
As ERO estão presentes em todos os organismos e são um produto da formação de água a partir da molécula de oxigênio (O_2). Esta molécula possui 12 elétrons e é estável. É um birradical com dois elétrons desemparelhados.

Inicialmente, no metabolismo aeróbio, o (O_2) sofre redução univalente, ganha um elétron e forma o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), considerado instável por ter número ímpar de elétrons (13) na última camada. Ao todo, o (O_2) ganha quatro elétrons e sofre redução tetravalente, formando H_2O e outras espécies reativas (Figura 5).

Dentre as espécies reativas conhecidas, as que possuem radical são: oxigênio (O_2), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hidroperoxila (HO_2^\bullet), radical hidroxila (HO^\bullet), radical peroxila orgânico (ROO^\bullet) e radical alcóxila (RO^\bullet). As que não possuem radical são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ozônio (O_3) e ácido hipocloroso (HOCl) (SILVA, P. M., 2009).

Na figura 5 vemos a redução tetravalente do (O_2) e a produção de espécies reativas intermediárias, tais como superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroperoxila (HO_2^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (HO^\bullet). A redução completa do (O_2) ocorre na mitocôndria e as ERO são neutralizadas com a entrada de quatro elétrons (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Figura 5. Redução tetravalente do oxigênio na mitocôndria até a formação de água.



FONTE: adaptado de COHEN, 1989; BAYNES e DOMINICZAK, 2015.

Na respiração mitocondrial, estima-se que cerca de 0,1 a 1% do (O_2) usado consiga formar o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) pelo escape de elétrons dos complexos que compõem a cadeia respiratória (AUGUSTO, 2006; SILVA, P. M., 2009). Além da respiração mitocondrial, as ERO também são produzidas através de enzimas (oxigenases e desoxigenases) e outras moléculas, responsáveis por consumir de 10% a 15% do (O_2) presente em células aeróbias (SILVA, P. M., 2009).

1.4.4 As principais ERO

O radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) é formado após a primeira redução do (O_2). Esse radical ocorre em quase todas as células aeróbias e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. O radical ($\text{O}_2^{\bullet -}$) é pouco reativo em soluções aquosas, não é citotóxico, mas é capaz de gerar radicais secundários extremamente tóxicos, como o radical hidroxila (HO^{\bullet}). (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; CAMPOS e YOSHIDA, 2004).

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é um dos estados excitados do O_2 . Apresenta dois elétrons emparelhados que podem estar num mesmo orbital ou em orbitais diferentes. Pode ser gerado na maioria dos seres vivos por reações que envolvem enzimas (peroxidases), pela reação de ozônio com biomoléculas e pelo processo de lipoperoxidação (RONSEIN *et al.*, 2006). Este radical pode ser produzido *in vitro*, através da reação de peróxido de hidrogênio com hipoclorito de sódio (SCHWEITZER e SCHMIDT, 2003), com ânion hipoclorito ou com peroxinitrito (RONSEIN *et al.*, 2006). O ($^1\text{O}_2$) interage com outras moléculas através de reações químicas ou transferindo sua energia de excitação, que pode ser captada por carotenoides, bilirrubina, tocoferóis, fenóis e por azida. Pode ainda reagir com compostos fenólicos, formando hidropoxidienonas, e com sulfetos, formando sulfóxidos ou outros compostos (RONSEIN *et al.*, 2006).

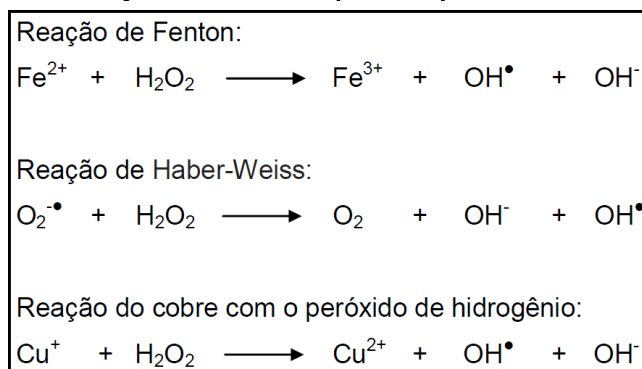
Muitos estudos *in vitro* têm mostrado que o $^1\text{O}_2$ oxida biomoléculas incluindo lipídios, proteínas, aminoácidos (triptofano, histidina, tirosina, metionina, cisteína e cistina), ácidos nucleicos, carboidratos e tióis através dos mecanismos acima citados (RONSEIN *et al.*, 2006). Apesar dos vários efeitos negativos, o oxigênio singlete possui aplicações médicas, por exemplo, seu uso como espécie ativa na terapia fotodinâmica, na qual é produzido para matar células com câncer.

O radical hidroperoxila ($\text{HO}_2\cdot$) é a forma protonada do radical superóxido. Possui um próton hidrogênio. Segundo HALLIWELL, este radical tem facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas, entretanto, é menos reativo que o superóxido (CAMPOS e YOSHIDA, 2004). No entanto, existem evidências de que esse radical é mais reativo que o superóxido (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não possui elétrons desemparelhados na última camada e, portanto, não é um radical livre. Essa molécula é extremamente deletéria, pois participa das reações que produzem o radical hidroxila, seja via reação de Fenton ou de Haber-Weiss. Tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro (Fe^{2+}). Sua citotoxicidade é bem alta e pode ser aumentada de dez para mil vezes na presença de ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; CAMPOS e YOSHIDA, 2004).

O radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) é a espécie mais reativa em sistemas biológicos. É capaz de se combinar rapidamente com metais e outros radicais. Pode atacar moléculas de DNA que estejam ligadas a metais, provocando modificações de bases purínicas, pirimidínicas, inativação ou mutação do DNA. Pode inativar várias proteínas e enzimas ao oxidar seus grupos sulfidrilas ($-\text{SH}$) e pontes dissulfeto ($-\text{SS}$). Também inicia a oxidação ácidos graxos polinsaturados de membranas celulares, retirando átomos de hidrogênio do grupo metileno, iniciando a peroxidação lipídica e a lise da membrana celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Esse radical pode ser formado *in vivo* (Figura 6), em reações de peróxido de hidrogênio com íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^+), através da reação de Fenton e de Haber-Weiss (CAMPOS e YOSHIDA, 2004).

Figura 6. Formação de hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio.

FONTE: adaptado de ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; DA COSTA, 2010.

1.4.5 O íon de ferro e a formação de ERO

A relação entre os metais e a formação *in vitro* das ERO é mostrada na figura 6. Através da reação de Fenton, na presença de metais (Fe^{2+} , Cu^+) o H_2O_2 acaba originando o radical hidroxila (HO^\bullet). O cobre pode catalisar a reação de Haber-Weiss; porém, no organismo, o ferro é quem possui maior abundância e maior capacidade catalisadora nas reações de oxidação de biomoléculas.

No traumatismo craniano, pode ocorrer a possível formação de espécies reativas de oxigênio através da reação de Fenton. Os riscos de lesão induzidos por esse trauma podem ser ampliados pela liberação de ferro intracelular, pela baixa capacidade de ligação ferro-proteína e pela deficiência de enzimas antioxidantes no sistema nervoso central (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Animais experimentais, ao receberem um quelante de ferro, apresentaram diminuição da degeneração cerebral pós-trauma. Possivelmente, quando o ferro liberado após o trauma foi aprisionado, ocorreu inibição da formação das espécies reativas catalisadas pelo ferro (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

Corações de ratos submetidos a sobrecarga de Fe^{3+} , após a reperfusão (falta de sangue em um órgão ou tecido, seguida pelo seu retorno), tiveram decréscimo na capacidade de contração do miocárdio. Supõe-se que, pela reação de Haber-Weiss, o Fe^{3+} em excesso promova acúmulo de espécies reativas, como o (HO^\bullet). O excesso de Fe^{3+} e o acúmulo de hidroxila podem estimular a lipoperoxidação de membranas, resultando na diminuição da contratilidade miocárdica (VAN DER KRAAIJ *et al.*, 1988). Lesões teciduais, como as que ocorrem em tumores e na artrite reumatoide, geram espécies reativas por reações catalisadas pelo ferro que, em sangramentos, é liberado junto com a hemoglobina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

1.4.6 Sistema de defesa antioxidante

O estresse oxidativo pode ser produzido por elevados níveis de ERO e por defeitos no metabolismo, resultando no surgimento de várias doenças tais como desordens degenerativas, doenças cardiovasculares, doença de Parkinson, câncer e o processo de envelhecimento (SHASHOUA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007). A oxidação de um substrato por uma espécie reativa ocorre a partir de uma reação em cadeia (iniciação, propagação e terminação). Por isso, a ação dos antioxidantes é avaliada através de vários mecanismos (PRESA, 2013). Antioxidantes são substâncias que atrasam, previnem ou removem o dano oxidativo de uma molécula alvo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006) ou que neutralizam/previnem a oxidação de substratos (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005).

Os antioxidantes preventivos são os que previnem a formação de ERO, inibindo as enzimas pró-oxidantes ou participando da quelatação de íons metálicos (PRESA, 2013). Os bloqueadores de cadeia são os que eliminam diretamente as espécies reativas (ZHANG, 2006) e os reparadores são aqueles que servem para reparar a lesão oxidativa (CAMPOS e YOSHIDA, 2004). É possível que um mesmo antioxidante pertença a mais de uma categoria (Tabela 3).

Tabela 3. Mecanismos de ação de alguns antioxidantes endógenos e exógenos.

Antioxidantes bloqueadores de cadeia	Antioxidantes preventivos	Antioxidantes reparadores
albumina, bilirrubina e ácido úrico	metalotionina, transferrina, ceruplasmina	
vitamina C	mioglobina, ferritina, selênio	vitamina C
carotenos, ácido lipóico, coenzima Q ₁₀	EDTA (ácido etilenodiamino tetracético)	
	DTPA (ácido dietilenotriamino pentacético)	
glutaciona reduzida	glutaciona reduzida	glutaciona redutase
catalase, superóxido dismutase	catalase, superóxido dismutase	
vitamina E, flavonoides	vitamina E, flavonoides	
glutaciona peroxidase	glutaciona peroxidase	glutaciona peroxidase

FONTE: adaptado de SOMOGYI *et al.*, 2007; CAMPOS e YOSHIDA, 2004.

Dentre os antioxidantes preventivos mais conhecidos estão a glutaciona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutaciona peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. Dentre os reparadores estão glutaciona redutase (GSH-Rd), glutaciona peroxidase (GSH-Px) e vitamina C (CAMPOS e YOSHIDA, 2004).

As células possuem um sistema antioxidante que atua em dois principais mecanismos (FIDELIS, 2014). O primeiro mecanismo de defesa antioxidante atua evitando a ação e a formação de ERO, através de doadores de elétrons, quelantes metálicos e sequestradores de espécies reativas (NATHAN e CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013). Já o segundo mecanismo de defesa é geralmente exercido por enzimas e consiste no reparo de lesões ocorridas nas células, evitando um maior estresse oxidativo em decorrência da lesão (VALKO *et al.*, 2007; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

1.4.7 Antioxidantes biológicos e sintéticos

O excesso de oxidantes causa desequilíbrio entre as espécies reativas e o sistema antioxidante, resultando em danos celulares e surgimento de doenças. Para evitar isso, já que os antioxidantes endógenos nem sempre são suficientes, os seres vivos obtêm moléculas antioxidantes exógenas para complementar sua ação (GUPTA *et al.*, 2012).

Além das categorias já citadas (mecanismos de ação, mecanismos de defesa e origem), os antioxidantes podem ser agrupados em biológicos e sintéticos. Nos humanos, dentre os antioxidantes biológicos de baixa massa molecular, podem ser destacados os de origem endógena, como o GSH, a bilirrubina e o ácido úrico. Já no grupo de origem exógena destacam-se carotenoides, tocoferóis e vitamina C (BABIOR, 1997).

Os antioxidantes sintéticos servem como aditivos para preservar alimentos. Os mais usados são os hidroxianilose butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), tert-butilhidroquinona (TBHQ) e galato propil (PG). Porém, esses aditivos são suspeitos de ter elevada citotoxicidade (VALENTÃO, 2002) e seu uso está sob regulação restrita devido ao perigo à saúde. Por exemplo, BHA e BHT têm sido suspeitos de causar câncer e danos no fígado (QI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2007).

Assim, é essencial a utilização de antioxidantes naturais multipotentes, que possuam mais de um mecanismo de ação antioxidante (PRESA, 2013), para proteger organismos contra as espécies reativas, retardar o progresso de muitas doenças e preservar as características dos alimentos (DA COSTA, 2010).

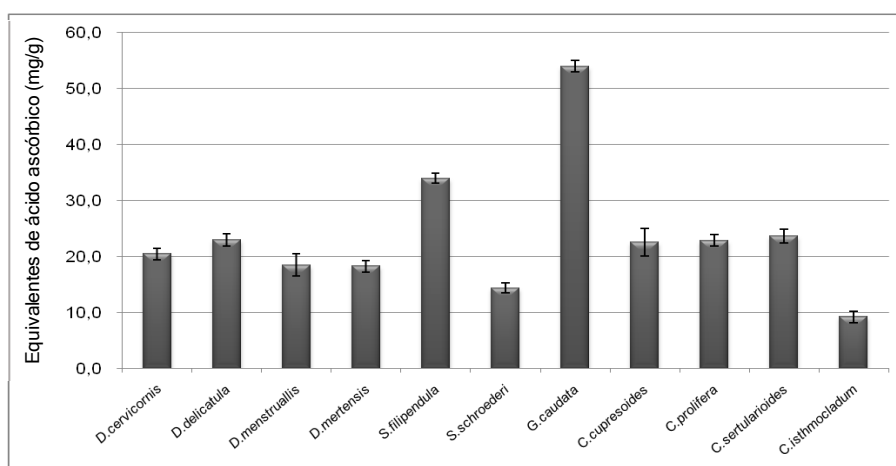
1.4.8 Polissacarídeos sulfatados antioxidantes de rodófitas

Vários estudos descrevem a atividade antioxidante dos PSs de rodófitas. Zhang e colaboradores (2003) isolaram três frações (F1, F2 e F3) de PS de *Phorphyra haitanensis* e observaram alto poder para sequestrar radical superóxido e um efeito mais fraco no sequestro de radicais hidroxila, bem como inibição significativa de peroxidação lipídica e inibição parcial da hemólise de eritrócitos de ratos induzida por peróxido de hidrogênio. Esta mesma equipe observou a administração intraperitoneal de F1 diminuiu a peroxidação lipídica em camundongos envelhecidos, apontando o possível uso de PSs para retardar o avanço do envelhecimento (ZHANG *et al.*, 2004).

Nosso grupo encontrou atividade antioxidante significativa para o sequestro de radicais superóxido e hidroxila em carragenanas iota, kappa e lambda, pertencentes respectivamente às algas *Euclima cottonii*, *Gigartina acicularis* e *Gigartina pissilata* (SOUZA *et al.*, 2007). Analisou-se a atividade total de extratos ricos em PS de 11 algas encontradas no litoral potiguar e constatou-se que todas apresentaram atividade antioxidante total (Figura 7). (COSTA, L. S. *et al.*, 2010).

Nos gêneros *Gracilaria* e *Hydropuntia*, as galactanas sulfatadas de *H. caudata* mostraram atividade doadora de elétrons através dos testes CAT e poder redutor. Foram capazes de estabilizar os radicais livres, quelar metais e sequestrar hidroxila (COSTA, 2008). Outro estudo, com PSs de *Gracilaria birdiae*, mostrou atividade antioxidante nos testes CAT, DPPH, sequestro de radical superóxido, quelação de ferro e de cobre (SOUZA, B. W. S. *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2014).

Figura 7. Capacidade antioxidante total de PS de algas marinhas presentes no litoral potiguar.



FONTE: COSTA *et al.*, 2010.

Recentemente, Costa e colaboradores (2014) publicaram uma revisão sobre a atividade antioxidante de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas. A revisão relatou também as atividades antioxidantes dos PSs encontrados em outras rodófitas, como se pode verificar na tabela 4.

Tabela 4. Variedade das atividades antioxidantes de diversas rodófitas.

Alga vermelha	Atividade Antioxidante	Referência
<i>Porphyra haitanensis</i>	DPPH; OH; QF; PL, O ₂ ⁻	ZHANG <i>et al.</i> , 2003, 2009; ZHAO <i>et al.</i> , 2006
<i>Porphyra yezoensis</i>	PR; OH; O ₂ ⁻ ; QF	LIU <i>et al.</i> , 2008; ZHOU <i>et al.</i> , 2008
<i>Eucheuma spinosa</i>	OH; PL; O ₂ ⁻	SOUZA <i>et al.</i> , 2007
<i>Eucheuma cottonii</i>	OH; PL; O ₂ ⁻	SOUZA <i>et al.</i> , 2007
<i>Gigartina acicularis</i>	OH; PL; O ₂ ⁻	SOUZA <i>et al.</i> , 2007
<i>Gigartina pisillata</i>	OH; PL; O ₂ ⁻	SOUZA <i>et al.</i> , 2007
<i>Hydropuntia caudata</i>	CAT; PR; OH; QF; O ₂ ⁻	COSTA <i>et al.</i> , 2008, 2010
<i>Gracilaria birdiae</i>	CAT; DPPH; OH; QF	SOUZA <i>et al.</i> , 2012; OLIVEIRA, 2014
<i>Gloiopeltis furcata</i>	DPPH; OH; O ₂ ⁻	SHAO <i>et al.</i> , 2013
<i>Gloiopeltis tenax</i>	DPPH	LIM e RYU, 2009
<i>Corallina officinalis</i>	PR; DPPH; O ₂ ⁻	YANG <i>et al.</i> , 2011

(CAT) Capacidade Antioxidante Total; (DPPH) Sequestro de DPPH; (O₂⁻) Sequestro de íons superóxido, (OH) Sequestro de radical hidroxila; (PL) peroxidação lipídica; (PR) Poder Redutor; (QF) Quelação Férrica.

FONTE: adaptado de COSTA *et al.*, 2014.

Fidelis e colaboradores (2014) publicaram um histórico sobre os estudos da última década, avaliando as atividades antioxidantes de PS extraídos de rodófitas, que em geral apresentam ótima atividade antioxidante nos testes mais comuns. Apesar dos bons resultados, ainda há um grande potencial a ser explorado nas rodófitas, inclusive as do litoral potiguar, que é rico em várias espécies.

1.5 Nanopartículas (Nps)

Segundo Khodashenas e Ghorbani (2015), o pesquisador japonês Norio Taniguchi, em 1974, foi o primeiro a introduzir o termo nanotecnologia. Através do tempo, a aplicação dessa ciência tornou-se comum em vários campos, tais como Ciências dos materiais, Eletrônica e Biotecnologia (DARROUDI *et al.*, 2012).

Em nanotecnologia, uma partícula é definida como um pequeno objeto que se comporta como uma unidade inteira no que diz respeito ao seu transporte e propriedades. Contudo, não há acordo que defina exatamente o tamanho de uma nanopartícula. Alguns autores afirmam que nanopartículas (Nps) são aquelas cujo tamanho varia de 1 a 100 nm (AHAMED *et al.*, 2010); já outros consideram que Nps possuem tamanhos maiores – em alguns casos, partículas de 10 até 1000 nm (1 μm) (MOHANRAJ e CHEN, 2006). As nanopartículas possuem propriedades (físicas, químicas, óticas e biológicas) que são fortemente influenciadas pelo seu tamanho, morfologia e estrutura (WEI *et al.*, 2015). Essas propriedades são diferentes até de outros nanomateriais, o que gera nos campos da nanociência e da nanotecnologia um grande interesse em sintetizar Nps com diferentes tamanhos e formatos, visando a busca de novas aplicações (AZIZI *et al.*, 2013).

1.5.1 Nanopartículas de prata (NpsAg): uma visão geral

Dentre os vários tipos de Nps, existe um grande número de trabalhos referentes a Nps metálicas. Elas podem ser usadas como superfície conveniente para a montagem de moléculas e podem ser compostas de materiais inorgânicos ou misturas de matérias inorgânicos e orgânicos (SALATA, 2004). Os metais mais usados são ferro, ouro e prata. Porém, outros metais também podem ser usados na síntese de Nps metálicas, como titânio e platina (SALATA, 2004).

Sobre nanopartículas de prata (NpsAg), pode-se dizer que elas são formadas a partir da redução de prata na presença de um composto redutor, que pode ser de origem orgânica ou não (WEI *et al.*, 2015). NpsAg tem atraído atenção em vista de sua boa condutividade, sua estabilidade química, seu uso como catalisador (HUSSAIN e PAL, 2008) e qualidades únicas, elétricas e óticas (LUE, 2001; RAI *et al.*, 2009). Além disso, possuem aplicações em várias indústrias, incluindo as ciências médicas (agentes contra o HIV) e indústrias de alimentos (agentes antibacterianos aplicados na embalagem de comidas) (AHMAD *et al.*, 2003).

Porém, assim como ocorre com outras Nps, as propriedades físicas, químicas e elétricas irão mudar dependendo de seu tamanho. Por isso, algumas características, tais como temperatura de fusão, comportamento magnético, potencial redox e cor podem ser controladas ao mudar seu tamanho e seus formatos (GURUNATHAN *et al.*, 2009).

Em vista disso, vários grupos de pesquisa estão sintetizando e testando diferentes NpsAg para utilização no campo biomédico (RYCENGA *et al.*, 2011). Há também estudos mostrando que os efeitos biológicos das NpsAg dependem das diferentes cargas de superfície de seus revestimentos, as quais podem afetar a interação das NpsAg com os sistemas vivos (POWERS *et al.*, 2011).

Além desses fatores, também pode ocorrer aglomeração de NpsAg após a sua síntese, um fenômeno que acontece com a maioria das Nps fabricadas. Por exemplo, a aglomeração de NpsAg ocorreu no citoplasma e no núcleo de células tratadas de hepatoma humano (HepG₂), induzindo estresse oxidativo intracelular (KIM *et al.*, 2009).

A oxidação da superfície das NpsAg é outro fenômeno que deve ser levado em consideração. Este evento resulta na dissolução das NpsAg e na liberação da prata sob a forma iônica, que pode então exercer sua atividade. Já a taxa dessa dissolução é afetada pelo meio circundante e depende do tamanho, das propriedades químicas e propriedades de superfície das Nps (MISRA *et al.*, 2012).

1.5.2 Síntese de nanopartículas de prata (NpsAg)

Na literatura há a descrição de vários métodos para sintetizar nanopartículas de prata; contudo, na maioria dos casos, esses métodos são onerosos e prejudiciais ao meio ambiente, sendo responsáveis por gerar alguns compostos químicos e tóxicos que podem causar efeitos adversos em aplicações finais (ASMATHUNISHA e KATHIRESAN, 2013). Por isso, há uma necessidade crescente de desenvolver a síntese “verde”, um processo que produz nanopartículas ambientalmente benignas.

Em razão disso, novos métodos vêm sendo propostos e utilizados para a síntese de nanopartículas; por exemplo, pesquisadores têm utilizado extratos biológicos para reduzir íons de prata, por meio de protocolos simples, e assim produzir nanopartículas desse metal. (ASMATHUNISHA e KATHIRESAN, 2013). Nesse tipo de síntese, a água é usada como solvente, substituindo solventes orgânicos tóxicos, e compostos biológicos são empregados como agentes redutores e estabilizadores para síntese de Nps metálicas (PARK *et al.*, 2011).

Assim, a síntese de nanopartículas de prata pode ser acionada por vários compostos tais como terpenóides, compostos fenólicos, flavononas, aminas, amidas, proteínas, pigmentos, alcalóides e outros agentes redutores presentes nos extratos

de plantas e de células microbianas (CHANDRAN *et al.*, 2006; MOHANPURIA *et al.*, 2007; LEELA e VIVEKANANDAN, 2008; TRIPATHY *et al.*, 2010; KUMAR, C. V. *et al.*, 2010). No entanto, o mecanismo exato da síntese de NpsAg por extratos biológicos ainda precisa ser melhor compreendido.

1.5.3 Aplicações biomédicas de nanopartículas

As Nps sintetizadas a partir de plantas, fungos e bactérias apresentam diversas aplicações na área biomédica (SCHRÖFEL *et al.*, 2014; WEI *et al.*, 2015). Além dessas, Schröfel e colaboradores (2014) mencionaram outras aplicações de Nps na remediação ambiental, na indústria e em outras áreas da nanotecnologia.

Em seu trabalho, Salata e colaboradores (2004) também listaram algumas das aplicações de nanomateriais na biologia e na medicina: marcação biológica fluorescente; carreação de fármacos e de genes; biodetecção de patógenos; detecção de proteínas; sondagem de estrutura de DNA; engenharia de tecidos; destruição de tumores via aquecimento; separação e purificação de moléculas biológicas e de células; melhoramento de contraste de imagem de ressonância magnética e, por último, estudos fagocinéticos.

Com relação as NpsAg, Wei e colaboradores (2015) mencionaram que já é bem documentada as funções dessas como agentes antibacterianos e antifúngicos. Por isso, esses autores optaram por descrever aplicações terapêuticas nas quais as NpsAg podem ser empregadas, incluindo: (I) agentes antivirais; (II) fotossensibilizadores e/ou radiosensibilizadores; (III) agentes anticâncer.

1.5.4 Síntese de NpsAg a partir de algas marinhas e suas atividades biológicas

Há poucos artigos descrevendo a síntese de NpsAg com algas (ASMATHUNISHA e KATHIRESAN, 2013) e não há um consenso no método a ser utilizado. São encontrados na literatura diferentes processos de síntese que utilizam extratos de algas como agentes redutores. Na maioria dos casos, utiliza-se o extrato aquoso (GOVINDARAJU *et al.* 2009; VIVEK *et al.*, 2011; ASMATHUNISHA e KATHIRESAN, 2013). Em trabalhos mais recentes, observa-se a síntese de NpsAg com PS isolados desses extratos, como as que foram feitas com os PSs isolados de *Turbinaria conoides* (VIJAYAN *et al.*, 2014).

Também se encontra em menor número trabalhos mostrando a síntese de NpsAg com extratos apolares de algas, por exemplo, NpsAg sintetizadas com extrato apolar de *Ulva fasciata*, obtido com acetato de etila (RAJESH *et al.*, 2012).

As NpsAg feitas com extratos de algas são na maioria das vezes avaliadas como agentes antifúngicos e antibacterianos. Na tabela 5 mostra-se vários exemplos de algas que foram utilizadas para a obtenção de extratos usados na síntese de NpsAg, bem como as principais atividades biológicas atribuídas a estas Nps.

Tabela 5. Diâmetro e atividades biológicas de NpsAg sintetizadas a partir de algas marinhas.

Alga marinha	Diâmetro das NpsAg	Atividades biológicas	Referências
<i>Colpomenia sinuosa</i>	20 nm	Atividade antibacteriana	EL-RAFIE <i>et al.</i> , 2013.
<i>Gelidiella acerosa</i>	22 nm (média)	Atividade antifúngica	VIVEK <i>et al.</i> , 2011.
<i>Gracilaria edulis</i>	35 nm (média)	Biossíntese de NpsAg	MURUGESAN <i>et al.</i> , 2011.
<i>Gracilaria corticata</i>	51,82 nm (média)	Atividade antifúngica	KUMAR, P. <i>et al.</i> , 2013b.
<i>Jania rubens</i>	12 nm	Atividade antibacteriana	EL-RAFIE <i>et al.</i> , 2013.
<i>Padina pavonica</i>	10 a 72 nm	Microbicida	SAHAYARAJ <i>et al.</i> , 2012.
<i>Porphyra vietnamensis</i>	13 ± 3 nm	Atividade antibacteriana	VENKATPURWAR e POKHARKAR, 2011.
<i>Pterocladia capillacea</i>	7 nm	Atividade antibacteriana	EL-RAFIE <i>et al.</i> , 2013.
<i>Sargassum cinereum</i>	45 a 76 nm	Atividade antibacteriana	MOHANDASS <i>et al.</i> , 2013.
<i>Sargassum muticum</i>	5 a 15 nm	Biossíntese de NpsAg	AZIZI <i>et al.</i> , 2013.
<i>Sargassum wightii</i>	8 a 27 nm	Atividade antibacteriana	GOVINDARAJU <i>et al.</i> , 2009.
<i>Turbinaria conoides</i>	2 a 17 nm	Atividade antibiofilme	VIJAYAN <i>et al.</i> , 2014.
<i>Ulva fasciata</i>	28 a 41 nm	Atividade antibacteriana	RAJESH <i>et al.</i> , 2012.
	7 nm	Atividade antibacteriana	EL-RAFIE <i>et al.</i> , 2013.
<i>Ulva flexouosa</i>	15 ± 1,5 nm	Biossíntese de NpsAg	RAHIMI <i>et al.</i> , 2014.
<i>Ulva lactuca</i>	48,59 nm (média)	Degradação fotocatalítica	KUMAR, P. <i>et al.</i> , 2013a.
	10 a 30 nm	Atividade antibacteriana	BHARATHI RAJA <i>et al.</i> , 2012.
<i>Urospora sp.</i>	20 a 30 nm	Atividade antibacteriana	SURIYA <i>et al.</i> , 2012.

FONTE: adaptado de ASMATHUNISHA e KATHIRESAN, 2013; EL-RAFIE *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2015.

Como observado na tabela 5, a grande maioria dos trabalhos descreve apenas a atividade antibacteriana para as NpsAg feitas com extratos de algas. Não se encontrou trabalhos que avaliassem outras atividades para essas nanopartículas; fato que não se justifica, já que extratos e PS de algas vem sendo descritos como possuidores de diferentes atividades biológicas tais como antioxidante, antitumoral e anticoagulante (COSTA, L. S. *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O intuito deste trabalho foi extrair da alga *Gracilaria birdiae* polissacarídeos sulfatados (PSs) e com eles sintetizar nanopartículas de prata (NpsAg) pelo método “verde”, a fim de potencializar a atividade quelante de ferro desses polissacarídeos sulfatados.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair PSs de *G. birdiae* utilizando uma metodologia já estabelecida;
- Testar a Capacidade Antioxidante Total do extrato rico em PSs;
- Sintetizar nanopartículas de prata com os PSs obtidos na etapa anterior;
- Confirmar a presença de NpsAg / PSs e determinar o seu tamanho;
- Determinar o teor de proteínas e açúcares presente nas NpsAg e nos PSs;
- Avaliar a capacidade quelante de ferro das nanopartículas e dos PSs de *G. birdiae*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Material biológico

A alga *Gracilaria birdiae* (Figura 8) foi escolhida devido a sua fácil disponibilidade. Ela foi coletada na praia de Rio do Fogo (latitude 05° 16' 16,61" Sul; longitude 35° 22' 54,29" Oeste) (Figura 9) e a levada para o Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais, do Centro de Biociências da UFRN, onde foi lavada para retirada das epífitas, crustáceos, inclusões calcárias e outros detritos. Após a lavagem, a alga foi seca em estufa a 60 °C, triturada e armazenada para depois ser utilizada no processo de extração de polissacarídeos. Na tabela 6 descreve-se a classificação taxonômica desta alga.

Figura 8. Alga vermelha *Gracilaria birdiae*.



FONTE: <https://goo.gl/FAjnBM>
(acessado em 26/06/15).

Figura 9. Local de coleta.



FONTE: <https://goo.gl/maps/r15ME>
(acessado em 26/06/15).

Tabela 6. Classificação do material biológico utilizado.

Classificação comum*	Classificação segundo ADL <i>et al.</i> (2005, 2012)
Filo: Rhodophyta	Supergrupo: Archaeplastida
Classe: Florideophyceae	Primeira categoria: divisão Rhodophyceae
Ordem: Gracilariales	Segunda categoria: subdivisão Florideophycidae
Família: Gracilariaceae	Terceira categoria: subdivisão Rhodymeniophycidae
Gênero: <i>Gracilaria</i>	Gênero: <i>Gracilaria</i>
Espécie: <i>Gracilaria birdiae</i>	Espécie: <i>Gracilaria birdiae</i>

* Esta classificação é antiga e atualmente não é recomendada.
Contudo, ainda é muito encontrada em diversos trabalhos científicos.

3.2 Outros Materiais

3.2.1 Reagentes

- Ácido ascórbico, ferrosina, albumina, D-galactose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA);
- Álcool etílico 96° (Sertanejo, Natal, RN, Brasil);
- Ácido clorídrico, ácido sulfúrico, álcool metílico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio (Diadma, SP, Brasil);
- Ácido etilenodiminotetracético (EDTA) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Metanol (Vetec, São Paulo, SP, Brasil);
- Cloreto de ferro (Merk, Darmstadt, Alemanha);
- Cloreto de sódio (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, SP, Brasil);
- Fenol, Molibdato de amônio, sulfato de cobre, sulfato de potássio e sulfato de sódio (Reagen Quimibrás S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Nitrato de prata (Casa Americana Ltda, Santa Cecília, SP, Brasil);
- Parafilm M® – PECHINEY Plastic Packaging, Inc. (Menasha, Wisconsin, EUA).
- Proxima® (Prozyn Biosolutions, São Paulo, SP, Brasil);
- Reagente de Bradford® (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EUA).

3.2.2 Equipamentos

- Agitador de tubos modelo AP 56 – PHOENIX Ltda. (Araraquara, SP, Brasil);
- Agitador magnético Q261-22 – QUIMIS Ltda. (Diadema, SP, Brasil);
- Analizador de potencial zeta – Zeta Plus - BROOKHAVEN (Holtsville, NY, EUA);
- Balança de precisão AY220 – MARTE/SHIMADZU (Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil);
- Balança analítica de precisão, banho maria TE-056 mag, bomba de vácuo TE-058 e dessacador de vidro – TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Centrifuga refrigerada 5804 R – EPPENDORF NORH AMERICA (Nova Iorque, EUA);
- Centrifuga Sorvall Legend XTR – THERMO SCIENTIFIC (Osterode am Harz, Alemanha);
- Destilador de água tipo Pilsen SL-71/10 – SOLAB (Piracicaba, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro – FEMTO Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Estufa de cultura 002 CB, Estufa 515, Estufa 330/5 – FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- Filtro Para Seringa Puradisc 25 mm 0,20 µm PTFE – WHATMAN - GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra);
- Leitor de microplacas Epoch – BIOTEK Instruments, Inc. (Winooski, VT, EUA);
- Liofilizador FreeZone 4.5 – LABCONCO (Kansas City, Missouri, EUA);
- Medidor de pH PHS 3B – PHTEK (Tóquio, Japão);

3.3 Métodos

3.3.1 Extração de polissacarídeos da alga *Gracilaria birdiae*

► 3.3.1.1 Coleta, limpeza e congelamento

As algas foram cultivadas em Rio do Fogo (RN) e coletadas. Limpou-se a biomassa para remoção de epífitas, crustáceos, inclusões calcárias e outros detritos através de enxágue com água corrente e catação manual. As algas foram armazenadas a -20 °C até o seu uso.

► 3.3.1.2 Descongelamento, enxágue da amostra e limpeza

As algas foram retiradas do freezer e colocadas numa bandeja para descongelar em temperatura ambiente. Depois disso, foram enxaguadas outra vez em água corrente e limpas novamente.

► 3.3.1.3 Secagem em estufa, trituração e pesagem

As algas foram espalhadas em duas bandejas de aço, forradas previamente com papel madeira, e foram colocadas na estufa, durante dois dias, a 60 °C. A amostra seca foi retirada da estufa, triturada num liquidificador, guardada em um béquer de dois litros, identificada e coberta com filme plástico.

► 3.3.1.4 Delipidação, descarte de etanol e secagem

A biomassa triturada foi colocada em um béquer de plástico. O volume do material correspondeu a 300 mL. Foi acrescentado 900 mL de álcool 96°, que levou a uma proporção de 3:1, correspondente ao volume de álcool e ao volume ocupado pelo pó da alga. Por último foram feitas três trocas de álcool. A biomassa triturada ficou em contato com o álcool por 24 h, a temperatura ambiente. A cada saturação de álcool (observada visualmente), foram feitos o descarte e a reposição desse reagente. Após a terceira troca, o etanol foi descartado em garrafas de vidro.

Cobriu-se uma bandeja de plástico com camadas de papel toalha e papel madeira. A biomassa delipidada foi colocada nessa bandeja e coberta com filme plástico, no qual foram feitas fileiras de cortes para que o álcool evaporasse mais rápido. A biomassa foi seca sob a luz do sol, em temperatura ambiente. O álcool evaporou e no final obteve-se um material despigmentado, apropriado para a extração de polissacarídeos.

► 3.3.1.5 Proteólise, peneiração, descarte da amostra e centrifugação

Depois de secar, a biomassa delipidada foi pesada e guardada na estante, dentro de um béquer coberto com filme plástico. Logo após, calculou-se a quantidade de cloreto de sódio (NaCl 0,25 M) a ser colocado em solução junto com a amostra, ou seja, dois volumes de cloreto de sódio para cada volume de amostra. Devido ao efeito geleificante da amostra algal, usou-se volume extra (± 200 mL) de NaCl (0,25 M) para diminuir a viscosidade da solução.

Retirou-se a amostra delipidada da estante e adicionou-se 250 mL de solução de NaCl (0,25 M). O pH da mistura foi ajustado para 8,0 com auxílio de uma solução de NaOH (4 M). A seguir, adicionou-se à mistura uma solução de Prozima® (enzima proteolítica), numa proporção de 15 mg para cada grama de amostra. O béquer contendo o material ficou em banho maria a 60 °C, durante 19 horas (adaptado de ROCHA *et al.*, 2005). Após esse período, o material foi filtrado para a retirada da biomassa. Em seguida a solução foi centrifugada a 10.000 g, durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Os PSs estavam no sobrenadante.

► 3.3.1.6 Precipitação de polissacarídeos

Mediu-se em uma proveta o volume de sobrenadante (320 mL). Adicionou-se metanol (640 mL) a dois volumes para um volume de amostra. A mistura foi despejada em um Erlenmeyer. O Erlenmeyer foi identificado, tampado com filme plástico, coberto com papel alumínio, colocado em um isopor e resfriado a 4 °C, permanecendo em repouso durante um dia, aproximadamente. O erlenmeyer foi retirado do isopor. A fase líquida foi descartada na pia.

► 3.3.1.7 Centrifugação, dessecação a vácuo, pesagem e armazenamento

A fase precipitada (corpo de fundo) foi agitada e centrifugada a 8000 g, durante 20 minutos, a 4 ° C. O sobrenadante foi descartado. O material precipitado foi colocado em um tubo cônico e levado para secar sob pressão atmosférica reduzida. Posteriormente, o material foi triturado, pesado e armazenado, protegido contra a luz.

3.3.2 Síntese de Nanopartículas de prata

Uma solução de PSs (40 mL, 10 mg/mL) foi misturada com outra solução de nitrato de prata (360 mL, 1 mM), em uma proporção de 1:9. A mistura de soluções foi mantida sob agitação, durante 24 horas, dentro de um Erlenmeyer coberto com papel alumínio (adaptado de DIPANKAR e MURUGAN, 2012). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 g durante 30 minutos. O material foi liofilizado e guardado em microtubos de centrífuga para uso posterior.

► 3.3.2.1 Detecção e medição das NpsAg por dispersão de luz dinâmica (DLS)

Medições de dispersão de luz dinâmica foram realizadas a 25 °C, no equipamento Zeta potential analyzer - BrookHaven, para a determinação do tamanho das Nps. A suspensão de Nps (0,25 mg/mL) foi filtrada (com filtro de 0,2 µm) e esta foi avaliada (total de 10 medidas) no equipamento. O valor do diâmetro das Nps foi expresso em média (\pm desvio padrão).

3.3.3 Atividade antioxidante de polissacarídeos e nanopartículas

► 3.3.3.1 Capacidade antioxidante total (CAT) dos PSs

O princípio deste ensaio se baseia na redução de Molibdênio (Mo^{+6}) para Molibdênio (Mo^{+5}), através da ação da amostra aplicada, e a subsequente formação de um complexo esverdeado de Fosfato/ Mo^{+5} em pH ácido (PRIETO et al., 1999; KUMARAN e KARUNAKARAN, 2007). O padrão usado para atividade antioxidante foi o ácido ascórbico (vitamina C). A amostra foi adicionada a uma solução reagente (4 mM de molibdato de amônia + 0,6 M de ácido sulfúrico + 28 mM de fosfato de sódio). A solução foi mantida a 100 °C durante 90 minutos; depois resfriou a temperatura ambiente, por 30 minutos. A absorbância de cada solução foi medida a 695 nm contra um “branco” (água destilada + solução reagente). A capacidade antioxidante total foi expressa em equivalentes de ácido ascórbico (miligramas de vitamina C / gramas de amostra).

► 3.3.3.2 Quelação de íons de ferro

A capacidade quelante de ferro do extrato dos PSs de *G. birdiae* e das nanopartículas foi investigada utilizando o método descrito por DECKER e WELCH (1990) e modificado posteriormente por WANG *et al.* (2008). A amostra foi adicionada em diferentes concentrações (0,1 até 2 mg/mL) a uma mistura de reagentes que continha FeCl_2 (0,05 mL, 2 mM) e ferrozina (0,2 mL, 5 mM). Essa mistura foi agitada e incubada durante 10 minutos, a temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida a 562 nm contra um branco (água destilada). O EDTA foi utilizado como controle positivo.

3.3.4 Caracterização química de polissacarídeos e nanopartículas

► 3.3.4.1 Dosagem de proteínas totais

A quantificação de proteínas foi determinada utilizando o reagente de Bradford®, de acordo com o método mencionado por BRADFORD (1976) e por MELO *et al.* (2013). Um total de 10 μL da solução de amostra (10 mg/mL) foi aplicada em triplicata, em uma microplaca de 96 poços. Acrescentou-se à amostra 200 μL de reagente de Bradford® em um volume pré-determinado. Após 10 minutos, a temperatura ambiente, a microplaca com amostra e reagente foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. Uma curva de albumina, variando de 0 a 50 μg , foi utilizada como padrão.

► 3.3.4.2 Dosagem de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados através da metodologia descrita por DUBOIS *et al.* (1956), empregando o uso de fenol/ácido sulfúrico e utilizando D-galactose como padrão. O teor de açúcares existente em cada extração foi calculado com base em valores expressos em leitura por espectrofotometria a 490 nm.

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção de PSs de *Gracilaria birdiae*

O primeiro passo para a extração dos PS foi a delipidação da alga. Neste, utilizou-se 86,4 g de alga. Durante esse processo, foram realizadas três trocas de etanol. Depois de seca e pesada, a amostra apresentou um ganho de massa de 3,93% após a secagem. Em seguida, depois das etapas de proteólise, centrifugação e dessecação a vácuo, obteve-se 1,16 g de um extrato rico em polissacarídeos sulfatados (PSs), corresponde a 1,3% do peso seco da alga delipidada (89,8 g).

4.2 Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) de PSs

Os PSs foram avaliados em relação a sua capacidade antioxidante total, com intuito de determinar o seu potencial para a formação de NpsAg. Os resultados mostraram que 1 g de extrato delipidado, proteolisado e seco apresentou em média uma CAT equivalente a $45,83 \pm 0,03$ mg de ácido ascórbico.

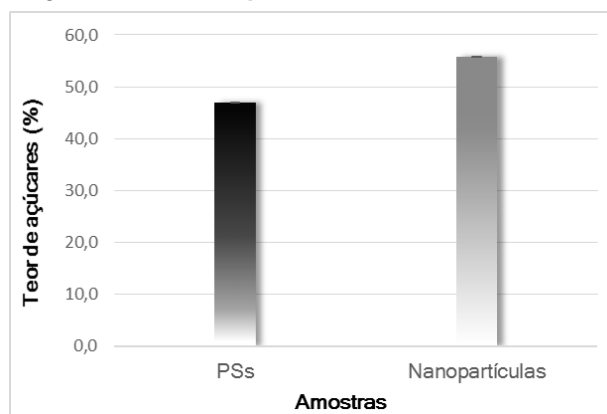
4.3 Síntese de nanopartículas de prata (NpsAg) a partir de PSs

Os PSs foram usados para produzir nanopartículas de prata a partir de nitrato de prata, sob agitação, como descrito anteriormente em métodos. A partir de 400 mg de amostra em solução foram obtidos 17 mg de Nps liofilizadas, correspondendo a um rendimento de 4,25%. Estas nanopartículas, após filtração, tiveram seu diâmetro analisado, como já foi descrito, e o resultado obtido foi em média $117,64 \pm 4,31$ nm.

4.4 Dosagem de açúcares totais presentes em PSs e em NpsAg

A suspensão com NpsAg e a solução com PSs foram submetidas a dosagens de açúcares para confirmar a presença de polissacarídeos. Identificou-se que a suspensão com NpsAg é constituída por 55,7% de polissacarídeos. Na solução com PSs, verificou-se um teor de 46,9% de açúcares totais (Figura 10.)

Figura 10. Teor de polissacarídeos das amostras.



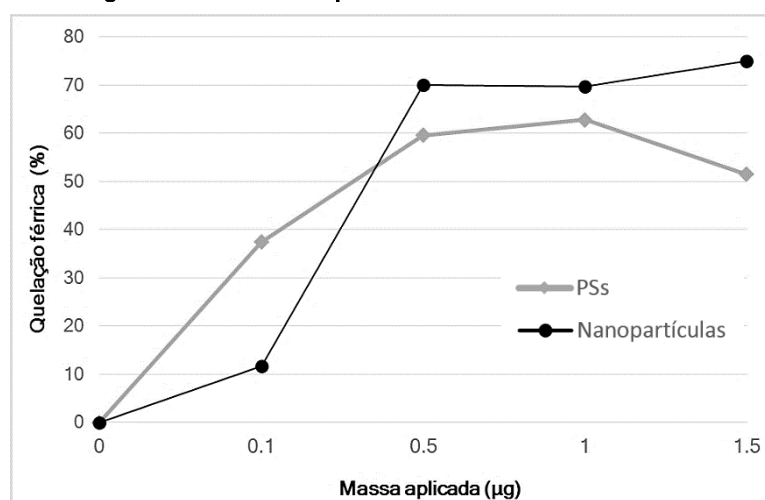
4.5 Dosagem de proteínas totais presentes em PSs e em NpsAg

O teor proteico das amostras também foi determinado. Observou-se que tanto na solução com PSs quanto na suspensão com NpsAg não se identificou a presença de proteínas nas condições testadas. Ou seja, as amostras estavam livres da contaminação por proteínas.

4.6 Avaliação da capacidade quelante de íons de ferro

Na figura 11 mostra-se os dados das análises de quelação férrica com as amostras. A solução com PSs e a suspensão com NpsAg apresentaram atividade quelante de ferro. Nos dois casos, pode-se verificar que as amostras tiveram um aumento expressivo de suas atividades quando se compara as concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL. Este aumento de atividade não foi observado nas demais concentrações, o que indica um platonização da atividade quelante das amostras. Percebe-se que, com exceção da concentração 0,1 mg/mL, a atividade da suspensão com nanopartículas, nas demais concentrações, foi maior do que a da solução com extrato rico em PSs. A atividade máxima (75%) foi obtida na concentração de 1,5 mg/mL da suspensão com Nps.

Figura 11. Atividade quelante de ferro das amostras.



5. DISCUSSÃO

A alga *Gracilaria birdiae* é cultivada no Brasil para alimentação humana e extração de hidrocolóides. Estas algas sintetizam moléculas com potencial farmacológico e biológico, como os polissacarídeos sulfatados, por exemplo.

Sabe-se que compostos sob a forma de nanopartículas podem ter suas atividades potencializadas. Porém, em relação à alga *G. birdiae*, nunca se avaliou a potencialização da atividade antioxidante de seus polissacarídeos sulfatados (PSs) sob a forma de nanopartículas de prata (NpsAg). Para testar tal potencialização, produziu-se neste trabalho nanopartículas de prata, a partir dos polissacarídeos dessa alga, e avaliou-se o seu potencial como agente quelante de ferro.

Observou-se que após a delipidação da alga, houve um aumento da massa da amostra. Acredita-se que este aumento ocorreu devido a amostra ter a capacidade de absorver água atmosférica. Vale salientar que, durante a realização desta etapa, as condições climáticas eram favoráveis para uma alta umidade atmosférica. Não foi possível verificar se isso também ocorreu com outras algas, pois os trabalhos consultados não apresentaram este dado.

É comum as rodofíceas marinhas apresentarem capacidade antioxidante. Entretanto, são poucos os relatos sobre rodofíceas cuja CAT foi avaliada, sendo mais comum encontrar tal informação em trabalhos com algas verdes e marrons. No total, foram encontrados dois relatos sobre a CAT de rodofíceas: um sobre a *Gracilaria (Hydropuntia) caudata* (COSTA, L. S. *et al.*, 2010) e outro sobre a *Gracilaria birdiae* (FIDELIS *et al.*, 2014). A escassez de dados torna necessária a realização de estudos futuros sobre a atividade antioxidante de rodofíceas.

Sabe-se que, para produzir nanopartículas de prata, é importante que o composto utilizado na síntese tenha capacidade de doar elétrons e reduzir a prata. Uma forma de avaliar esta capacidade é através do teste de capacidade antioxidante total (CAT). Os dados indicaram que os PSs foram capazes de reduzir a prata e formar nanopartículas, pois 1 g de amostra apresentou em média uma CAT equivalente a 45,83 mg de ácido ascórbico.

Este valor se assemelha ao descrito por Fidelis e colaboradores (2014). Este grupo obteve de *G. birdiae* um extrato rico em PSs, utilizando a mesma metodologia empregada neste trabalho. O grupo encontrou uma média de CAT equivalente a 40 mg de ácido ascórbico, indicando que nosso resultado corresponde as expectativas.

Diante do resultado da CAT, o extrato com PSs foi utilizado para a síntese de NpsAg. A leitura por dispersão de luz dinâmica indicou que foi possível sintetizar nanopartículas de prata com o extrato testado. As nanopartículas apresentaram um tamanho alto em comparação àquelas sintetizadas com extratos de outras algas.

As nanopartículas de prata sintetizadas a partir do extrato rico em polissacarídeos de *Sargassum muticum* apresentaram tamanhos de 5 a 15 nm (AZIZI *et al.*, 2013); as de *Ulva lactuca*, um tamanho de 48,6 nm (KUMAR, P. *et al.*, 2013a); as de *Sargassum cinereum*, tamanhos de 45 a 76 nm (MOHANDASS *et al.*, 2013). Estes diferentes tamanhos não parecem estar relacionados com o gênero das algas, pois as Nps sintetizadas com as algas do gênero *Sargassum* apresentaram tamanhos diferentes. É provável que as moléculas presentes nos extratos das algas tenham uma grande importância para delinear o tamanho das Nps.

Outro fator importante que pode influenciar o tamanho das nanopartículas é a velocidade de agitação empregada durante a sua síntese. Quando a velocidade é muito rápida, ocorre a formação de nanopartículas pequenas, como aquelas obtidas de *S. muticum* (AZIZI *et al.*, 2013). Quando a velocidade é mais lenta, como no nosso caso, leva a formação de partículas maiores.

As proteínas são contaminantes difíceis de retirar de extratos ricos em polissacarídeos algáceos. Fidelis e colaboradores (2014), utilizando extração aquosa com auxílio de ultrassom, obtiveram um extrato rico em PSs de *G. birdiae* com 3% de contaminantes proteicos – um resultado acima do nosso. Talvez a ausência de proteínas em nosso extrato tenha ocorrido por causa da proteólise enzimática, a qual pode ter destruído as proteínas presentes em nossa amostra.

Em relação ao teor de açúcares, observa-se que foi maior na suspensão com NpsAg do que na solução com PSs. Acredita-se que isso ocorra devido a uma maior afinidade da prata com os PS do que com os demais componentes do extrato.

Os PS de *G. birdiae* são sulfatados; portanto, além do grupo OH, também possuem grupos sulfatos capazes de reduzir e se ligarem a prata. Corroborando com essa hipótese os dados obtidos por Venkatpurwar e Pokharkar (2011), os quais sintetizaram a partir da alga *Porphyra vietnamensis* nanopartículas de prata com extratos ricos em PSs. Quando analisaram as nanopartículas por espectroscopia de infravermelho, observaram que os sinais (picos) de sulfato livre existente no extrato sumiram após a formação de nanopartículas. Isso indica que o sulfato ao mesmo tempo reduziu e ligou-se a prata.

Quando o extrato de *G. birdiae* foi transformado em nanopartículas, isso aumentou a sua atividade quelante de ferro. Nas concentrações de 0,5 e de 1 mg/mL, a atividade quelante, em geral, subiu de $\approx 60\%$ (no caso do PSs) para $\approx 70\%$ (no caso das nanopartículas) – um aumento de 10%. Este aumento poderia ser explicado devido ao maior teor de PS na suspensão com nanopartículas.

Contudo, este aumento no teor de polissacarídeos só foi de 8,8%. Quem seria o responsável pelo restante da atividade quelante? Uma explicação plausível seria a mudança da conformação dos polissacarídeos quando estes se ligam a prata. Esta mudança os deixaria mais ativos como agentes quelantes de ferro. Estudos futuros confirmarão esta hipótese.

6. CONCLUSÕES

- Foi obtido um extrato rico em PSs da alga *Gracilaria birdiae* que apresentou capacidade antioxidante total;
- Foi possível sintetizar NpsAg com os PSs de *Gracilaria birdiae*, livres de contaminação proteica, com alto teor de açúcares totais e tamanho médio em torno de 117,6 nm;
- O extrato rico em polissacarídeos da alga *Gracilaria birdiae* apresentou potente atividade quelante de ferro;
- Esta atividade foi otimizada quando esse extrato estava na forma de nanopartículas de prata.

7. REFERÊNCIAS

ADL, S.M. *et al.* **The revised classification of eukaryotes.** *Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 59, n. 5, p. 429-514, 2012.

AHMAD, A. *et al.* **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 28, n. 4, p. 313-318, 2003.

AHAMED, M.; ALSALHI, M. S.; SIDDIQUI, M. K. J. **Silver nanoparticles applications and human health.** *Clinica Chimica Acta*, v. 411, p. 1841-1848, 2010.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. *et al.* **Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

ASMATHUNISHA, N.; KATHIRESAN, K. **A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 103, p. 283-287, 2013.

AUGUSTO, O. **Radicais Livres: bons, maus e naturais.** São Paulo: Oficina de Textos. 2006. 115p.

AZIZI, S. *et al.* **Biosynthesis of silver nanoparticles using brown marine macroalga, *Sargassum muticum* aqueous extract.** *Materials*, v. 6, p. 5942-5950, 2013.

BABIOR, B. M. **Superoxide: a two-edged sword.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, n. 2, p. 141-155, 1997.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica.** 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 656p.

BEZERRA, F. A. **Cultivo de algas marinhas como desenvolvimento de comunidades costeiras.** 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - PRODEMA/UFRN, Natal, Rio Grande do Norte.

BHARATHI RAJA, S. *et al.* **Biomimetic of silver nanoparticles by *Ulva lactuca* seaweed and evaluation of its antibacterial activity.** *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 4, n. 3, p. 139-143, 2012.

BHATT, J. S. A. **Heralding a new future - Nanotechnology.** *Current Science*, v. 85, n. 2, p. 147-154, 2003.

BIXLER, H. J.; PORSE, H. **A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry.** *Journal of Applied Phycology*, v. 23, p. 321-335, 2011.

BOHR, M. T. **Nanotechnology goals and challenges for electronic applications.** *IEEE Transactions on Nanotechnology*. v. 1, n. 1, p. 56-62, 2002.

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

CÂMARA-NETO, C. **Seaweed culture in Rio Grande do Norte, Brazil.** *Hydrobiologia*, v.151/152, p. 363-367, 1987.

CAMPOS, E. B. P.; YOSHIDA, W. B. **O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento.** *J Vasc Br*, Vol. 3, n. 4, p. 357-366, 2004.

CARDOSO, M. A. **Determinação da estrutura química de xilomananas e galactanas sulfatadas isoladas de macroalgas marinhas (Ceramiales, Rhodophyta).** 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Curso de pós-graduação em Bioquímica - UFPR, Curitiba, Paraná.

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

CHANDRAN, S. P. *et al.* **Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract.** *Biotechnology Progress*, v. 22, n. 2, p. 577-583, 2006.

CHIBATA, I.; TOSA, T.; SATO, T. **Application of carrageenan beads for chromatographic purification of proteins.** *Journal of Chromatography A*, v. 215, p. 93-98, 1981.

COHEN, M. V. **Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: Is this the time for clinical trials?** *Annals of Internal Medicine*. V. 111, n. 11, p. 918-31, 1989.

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

COSTA, L. S. **Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga vermelha *Gracilaria caudata*.** 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, UFRN, Natal, Rio Grande do Norte.

COSTA, M. S. S. P. *et al.* **Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*.** *Journal of Applied Phycology*, v. 24, n. 5, p. 1159-1167, 2012.

COSTA, M. S. S. P. *et al.* **Antioxidant sulfated polysaccharides from seaweed.** In: Vitor Hugo Pomin. (Org.). *Seaweeds. Agricultural uses, Biological and Antioxidant Agents*. 1ed. Nova Iorque: Nova Publishers, v. 1, p. 189-208, 2014.

CUNHA, P. L. R.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. **Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimentos em valor econômico.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DA COSTA, M. S. S. P. **Efeito da salinidade da água do mar no rendimento, composição e atividades biológicas de frações polissacarídicas da Chlorophyta *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*.** 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, UFRN, Natal, Rio Grande do Norte.

- DARROUDI, M.; ZAK, A. K.; MUHAMAD, M. R.; HUANG, N. M.; HAKIMI, M. **Green synthesis of colloidal silver nanoparticles by sonochemical method**. *Materials Letters*, v. 66. N. 1, p. 117-120, 2012.
- DECKER, E. A.; WELCH, B. **Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 674-677, 1990.
- DIPANKAR, C.; MURUGAN, S. **The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 98, p. 112-119, 2012.
- DIPANKAR, C.; MURUGAN, S. **The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 98, p. 112-119, 2012.
- DOS SANTOS, C. A. *et al.* **Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 103, p. 1931-1944, 2014.
- DUBOIS, M. *et al.* **Colorimetric method of determination of sugars and related substances**. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- EL-RAFIE, H. M.; EL-RAFIE, M. H.; ZAHRAN, M. K. **Green synthesis of silver nanoparticles using polysaccharides extracted from marine macro algae**. *Carbohydrate Polymers*, v. 96, n. 2, p. 403-410, 2013.
- FÁBIO, A. C. **Algas vermelhas do Nordeste são usadas na produção de cerveja e doces**. [online] Disponível na Internet via WWW. URL: <<http://goo.gl/ITN2Rs>>. Publicado em 27.09.13.
- FERNANDES, D. R. P.; OLIVEIRA, V. P.; VALENTIN, Y. Y. **Seaweed biotechnology in Brazil: six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities**. *Journal of Applied Phycology*, v. 26, p. 1923-1937, 2014
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FIDELIS, G. P. **Otimização da extração de polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria birdiae* e análise da atividade anticoagulante e antioxidante**. 2014. 135 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, UFRN, Natal, Rio Grande do Norte.
- FRESHWATER, D. W. **Rhodophyta: Red Algae**. Versão 24, Março 2000 (sob construção). Disponível em: <<http://goo.gl/L3IDFA>> no projeto *Tree of Life Web Project* <<http://tolweb.org/>>. Acesso em: 10 de maio de 2015.
- GENNADOIS, A. **Non-gelatin substitutes for oral delivery capsules, their composition and process of manufacture**. Patente n. WO 200010538 A1, 25 ago. 1998, 2 mar. 2000. Disponível em: <<http://goo.gl/l4eyrG>>. Acesso em: 11 ago. 2015.

- GOVINDARAJU, K. *et al.* Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a marine alga, *Sargassum wightii* Grevilli and their antibacterial effects. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 9, p. 5497-5501, 2009.
- GUPTA, S. C. *et al.* Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 16, n. 11, p. 1295-1322, 2012.
- GURUNATHAN, S. *et al.* Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 74, n. 1, p. 328-335, 2009.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Nova Iorque: Oxford University Press; 2006. 704p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HILL, W. R.; PILLSBURY, D. M. **Argyria: The pharmacology of silver**, 6 ed. Baltimore, Md: Williams & Wilkins Company, p. 128-132. 1939.
- HUSSAIN, S.; PAL, A. K. Incorporation of nanocrystalline silver on carbon nanotubes by electrodeposition technique. *Materials Letters*, v. 62, n. 12-13, p. 1874-1877, 2008.
- JAMES, E.M. Practical aspects of atomic resolution imaging and analysis in STEM. *Ultramicroscopy*, v. 78, n. 1-4, p. 125-139, 1999.
- JOHNSTON, H. J. *et al.* A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology*, v. 40, n. 4, p. 328-346, 2010.
- KARBOWIAK, T. *et al.* Effect of plasticizers (water and glycerol) on the diffusion of a small molecule in iota-carrageenan biopolymer films for edible coating application. *Biomacromolecules*, v. 7, n. 6, p. 2011-2019, 2006.
- KHODASHENAS, B.; GHORBANI, H. R. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*, p. 1-16, 2015.
- KIM, S. *et al.* Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, v. 23, n. 6, p. 1076-1084, 2009.
- KOUVARIS, P. *et al.* Green synthesis and characterization of silver nanoparticles produced using *Arbutus unedo* leaf extract. *Materials Letters*, v. 76, p. 18-20, 2012.
- KUMAR, P. *et al.* Photocatalytic degradation of methyl orange dye using silver (Ag) nanoparticles synthesized from *Ulva lactuca*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 103, p. 658-661, 2013a.
- KUMAR, P.; SELVI, S. S.; GOVINDARAJU, M. Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida* spp. *Applied Nanoscience*, v. 3, n. 6, p. 495-500, 2013b.

- KUMAR, V.; YADAV, S. C.; YADAV, S. K. ***Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, n. 10, p. 1301-1309, 2010.
- KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. ***In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India.** *LWT - Food Science and Technology*, v. 40, n. 2, p. 344-352, 2007.
- LAHAYE, M. **Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry.** *Journal of Applied Phycology*, v. 13, p. 173-184, 2001.
- LEELA, A.; VIVEKANANDAN, M. **Tapping the unexploited plant resources for the synthesis of silver nanoparticles.** *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 17, p. 3162-3165, 2008.
- LI, L. *et al.* **A polysaccharide-peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 75, n. 4, p. 863-869, 2007.
- LIM, B. L.; RYU, I. H. **Purification, structural characterization, and antioxidant activity of antioxidant substance from the red seaweed *Gloiopeltis tenax*.** *Journal of medical food*, v. 12, n. 2, p. 442-451, 2009.
- LIMA, A. M. *et al.* **Cultivo experimental de *Hypnea musciformis* e *Gracilaria* sp. em áreas protegidas por antigas linhas de costa (recifes) no litoral do Rio Grande do Norte.** In: *Projeto Algas*. Estado do Rio Grande do Norte. Série: Brasil. SUDENE. Estudos de pesca, v. 9, p. 97-107, 1981.
- LITTLER M. M. *et al.* **Deepest known plant life discovered on an uncharted seamount.** *Science*, v. 227, p. 57-59, 1985.
- LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações.** São Carlos: RiMa, 2006, p. 109-119, 588 p.
- LUE, J. T. **A review characterization and physical property studies of metallic nanoparticles.** *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 62, n. 9-10, p. 1599-1612, 2001.
- MANDAL *et al.* **Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*.** *Phytochemistry*, v. 69, p. 2193-2199, 2008.
- MARINHO-SORIANO, E. **Cultivo Experimental de *Gracilaria* no Rio Grande do Norte.** Salvador. p. 115-124, 2005.
- MARINHO-SORIANO, E.; BEZERRA, A. F. **Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil.** *Biomass & Bioenergy*, v. 34, p. 1813-1817, 2010.
- MARINHO-SORIANO, E.; CARNEIRO, C.; MOREIRA, W. S. C. **Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) in shrimp pond effluents in Brazil.** *Aquatic Research*, p. 1081-1086, 2002.

- MARINHO-SORIANO, E.; MOREIRA, W. S. C.; CARNEIRO, M. A. A. **Some aspects of the growth of *G. Birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in an estuary in Northeast Brazil.** *Aquaculture Internacional*, v. 14, n. 4, p. 327-336, 2006.
- MATA, R.; NAKKALA, J. R.; SADRAS, S. R. **Biogenic silver nanoparticles from *Abutilon indicum*: Their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects *in vitro*.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 128, p. 276-286, 2015.
- MELO, K. R. T. *et al.* **Evaluation of sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Dictyopteris justii* as antioxidant agents and as inhibitors of the formation of calcium oxalate crystals.** *Molecules*, v. 18, n. 12, p. 14543-14563, 2013.
- MISRA, S. K. *et al.* **The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies.** *Science of The Total Environment*, v. 438, p. 225-232, 2012.
- MOHANDASS C. *et al.* **Biosynthesis of silver nanoparticles from marine seaweed *Sargassum cinereum* and their antibacterial activity.** *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 75, n. 5, p. 606-610, 2013.
- MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. **Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, n. 3, p. 507-517, 2007.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. **Nanoparticles - a review.** *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.
- MURUGESAN, S.; ELUMALAI, M.; DHAMOTHARAN, R; **Green synthesis of silver nanoparticles from marine alga *Gracillaria edulis*.** *Biosci. Biotech. Res. Comm.* v. 4, n. 1, p. 105-110, 2011.
- NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. **Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species.** *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 5, 349-361. 2013.
- O'SULLIVAN. **Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications.** *Marine Drugs*, v. 8, p. 2038-2064, 2010.
- OLIVEIRA, E. C. **Algas marinhas: Um recurso pouco explorado pelo Brasil.** *Panorama da Aqüicultura*, v. 7, p. 24-26, 1997.
- OLIVEIRA, L. C. B. P. **Propriedades bioativas dos polissacarídeos sulfatados da alga comestível *Gracilaria birdiae*.** 2014. 26 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Departamento de Bioquímica, UFRN, Natal, Rio Grande do Norte.
- PARK, Y. *et al.* **Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles.** *IET Nanobiotechnology*, v. 5, n. 3, p. 69-78, 2011.
- POWERS, C. M. *et al.* **Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition.** *Environmental health perspectives*, v. 119, n. 1, p. 37-44, 2011.

- PRESA, F. B. **Atividades antioxidante e anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga verde *Udotea flabellum***. 2013. 50 f. Monografia (bacharelado em Ciências Biológicas) - Departamento de Bioquímica, UFRN, Natal, Rio Grande do Norte.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. **Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E**. *Analytical Biochemistry*, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- QI, H. *et al.* **Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 37, n. 4, p. 195-199, 2005.
- RAHIMI, Z. *et al.* **Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Ulva flexouosa* from the Persian Gulf, Iran**. *Journal of the Persian Gulf (Marine Science)*, v. 5, n. 15, p. 9-16 2014.
- RAI, M. **Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 103, p. 1931-1944, 2014.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. **Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials**. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.
- RAJAN, A.; VILAS, V.; PHILIP, D. **Catalytic and antioxidant properties of biogenic silver nanoparticles synthesized using *Areca catechu* nut**. *Journal of Molecular Liquids*, v. 207, p. 231-236, 2015.
- RAJESH, S. *et al.* **Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ulva fasciata* (Delile) ethyl acetate extract and its activity against *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum***. *Journal of Biopesticides*, v. 5, n. suplementar, p. 119-128, 2012.
- REBOURS *et al.* **Seaweeds: an opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities**. *Journal of Applied Phycology*, v. 26, p. 1939-1951, 2014.
- RINAUDO, M. **Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials**. *Polymer International*, v. 57, p. 397-430, 2008.
- ROCHA, H. A. O. *et al.* **Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schröderi*. An ideal antithrombotic agent?** *The journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 50, p. 41278-41288, 2005.
- RONSEIN, G. E. *et al.* **Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas**. *Química Nova*, Vol. 29, No. 3, p. 563-568, 2006.
- RYCENGA, M. *et al.* **Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications**. *Chemical Reviews*, v. 111, n. 6, p. 3669-3712, 2011.
- SAHAYARAJ, K.; RAJESH, S.; RATHI, J. M. **Silver nanoparticles biosynthesis using marine alga *Padina pavonica* (Linn.) and its microbicidal activity**. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*, v. 7, n. 4, p. 1557-1567, 2012.

- SALATA, O. V. **Applications of nanoparticles in biology and medicine.** *Journal of Nanobiotechnology*, v. 2, n. 3, p. 1-6, 2004.
- SAND, R. E.; GLICKSMAN, M. **Seaweed extracts of potential economic importance**, em *Industrial Gums*, 2ª edição, capítulo 9, p. 147-194, 1973. Editado por WHISTLER, R. L. Nova Iorque/Londres: Academic Press, Inc. Disponível em: <<https://goo.gl/1Txv3l>>. Acesso em: 23 ago. 2015.
- SANJEEB, K. S.; VINOD, L. **Nanotech approaches to drug delivery and imaging.** *Drug Discovery Today*, v. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.
- SCHRÖFEL, A. *et al.* **Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - a review.** *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 10, p. 4023-4042, 2014.
- SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R. **Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen.** *Chemical Reviews*, Vol. 103, No. 5, p. 1685-1757, 2003.
- SELBY, H. H.; WYNNE, W. H. **Agar**, em *Industrial Gums*, 2ª edição, capítulo 3, p. 29-48, 1973. Editado por Whistler, R. L. Nova Iorque/Londres: Academic Press, Inc. Disponível em: <<https://goo.gl/ijG1kS>>. Acesso em 23 ago. 2015.
- SEN, M.; AVCI, E. N. **Radiation synthesis of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-κ-carrageenan hydrogels and their use in wound dressing applications. I. Preliminary laboratory tests.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 74A, n. 2, p. 187-196, 2005.
- SHAMELI, K. *et al.* **Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Callicarpa maingayi* stem bark extraction.** *Molecules*, v. 17, n. 7, p. 8506-8517, 2012.
- SHANMUGAM, N. *et al.* **Biosynthesis of silver nanoparticles from the marine seaweed *Sargassum wightii* and their antibacterial activity against some human pathogens.** *Applied Nanoscience*, v. 4, n. 7, p. 881-888, 2014.
- SHASHOUA, V. E. *et al.* **New synthetic peptides can enhance gene expression of key antioxidant defense enzymes in vitro and in vivo.** *Brain Research*, v. 1024, n. 1-2, p. 34-43, 2004.
- SHUKLA, M. K. *et al.* **Synthesis and characterization of agar-based silver nanoparticles and nanocomposite film with antibacterial applications.** *Bioresource Technology*, v. 107, p. 295-300, 2012.
- SILVA, P. M. **Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras.** 2009. 76 f. Dissertação (Ciências Biológicas - Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, USP, São Paulo, São Paulo.
- SINGH, C. R.; KATHIRESAN, K.; ANANDHAN, S. **A review on marine based nanoparticles and their potential applications.** *African Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 18, p. 1525-1532, 2015.
- SOMOGYI, A. *et al.* **Antioxidant measurements.** *Physiological Measurement*, v. 28, n. 4, p. R41-R55, 2007.

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

SOUZA, *et al.* **Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds.** *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 2, p. 153-160, 2007.

SOUZA, M. C. R. *et al.* **Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds.** *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 2, p. 153-160, 2007.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. **Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application.** *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 483-501, 2011.

SURIYA, J. *et al.* **Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora* sp.** *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n.58, p. 12192-12198, 2012.

TANIGUCHI, N. **On the basic concept of nanotechnology.** In: Proc. of International Conference on Precision Engineering (ICPE), Tóquio, Japão, p. 18-23, 1974.

TRAN, Q. H.; NGUYEN, V. Q.; LE, A. T. **Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives.** *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, Volume 4, p. 1-20, 2013.

TRIPATHY, A. *et al.* **Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, n. 1, p. 237-246, 2010.

VALENTÃO, P. *et al.* **Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 17, p. 4989-4993, 2002.

VALKO, M. *et al.* **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** *Chemico-biological interactions*, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DER KRAAIJ, A. M. *et al.* **Iron load increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage.** *Circulation*, v. 78, n. 2, p. 442-449, 1988.

VENKATPURWAR, V.; POKHARKAR, V. **Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: Study of *in-vitro* antibacterial activity.** *Materials Letters*, v. 65, n. 6, p. 999-1002, 2011.

VERA *et al.* **Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants.** *Marine Drugs*, v. 9, p. 2514-2525, 2011.

VIJAYAN, S. *et al.* **Synthesis and characterization of silver and gold nanoparticles using aqueous extract of seaweed, *Turbinaria conoides*, and their antimicrofouling activity.** *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1-10, 2014.

- VIVEK, M. *et al.* **Biogenic Silver Nanoparticles by Gelidiella acerosa Extract and their Antifungal Effects.** *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, v. 3, n. 3, p. 143-148, 2011.
- WANG, J. *et al.* **Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from Laminaria japonica.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 42, n. 2, p. 127-132, 2008.
- WI, L. *et al.* **Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications.** *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 5, p. 595-601, 2015.
- WISE, R.R.; HOOBER, J. K. **The Structure and Function of Plastids.** Impresso na Holanda: Springer, 2007, p. 3-26. Disponível em: <<https://goo.gl/QUfa43>>. Acesso em: 10 de maio de 2015.
- WOELKERLING, W. J. **An introduction in Biology of the Red Algae.** Editado por COLE, K. M. e por SHEATH, R. G. Nova Iorque: Cambridge University Press, 1990, p. 1-6, 505 p. Disponível em: <<https://goo.gl/YvBJFj>>. Acesso em: 10 de maio de 2015.
- YI, Y.; NEUFELD, R. J.; PONCELET, D. **Immobilization of cells in polysaccharide gels.** *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, editado por DIMITRIU S. M. D., Nova Iorque, pp. 867-891, 2004.
- ZHANG, H. Y.; YANG, D. P.; TANG, G. Y. **Multipotent antioxidants: from screening to design.** *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 15-16, p. 749-754, 2006.
- ZHANG, Q. *et al.* **The structure of a sulfated galactan from Porphyra haitanensis and its in vivo antioxidant activity.** *Carbohydrate Research*, v. 339, n. 1, p. 105-111, 2004.
- ZHANG, Q. *et al.* **Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from Porphyra haitanensis.** *Journal of Applied Phycology*, v. 15, n. 4, p. 305-310, 2003.
- ZHOU, G. *et al.* **Effect of low molecular λ -carrageenan from Chondrus ocellatus on antitumor H-22 activity of 5-Fu.** *Pharmacological Research*, v. 53, n. 2, p. 129-134, 2006.
- ZONG *et al.* **Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research.** *Carbohydrate Polymers*, v. 90, p. 1395-1410, 2012.