



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

BRUNNA FERNANDA LIRA PATRIOTA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MACROALGA *BOTRYOCLADIA
OCCIDENTALIS* (BORGESSEN) KYLIN DO LITORAL DE PERNAMBUCO.**

Recife - PE

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA**

BRUNNA FERNANDA LIRA PATRIOTA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MACROALGA *BOTRYOCLADIA
OCCIDENTALIS* (BORGESSEN) KYLIN DO LITORAL DE PERNAMBUCO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Recife– PE

2018

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Patriota, Brunna Fernanda Lira

Extração, caracterização e atividade citotóxica de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Botryocladia occidentalis* (Borgesen) Kylin do litoral de Pernambuco / Brunna Fernanda Lira Patriota - 2018.

96 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ricardo Yara

Coorientadora: Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Recife, 2017

Inclui referências e apêndices

1. Polissacarídeos 2. Citocinas 3. Algas I. Yara, Ricardo (orient.) II. Lima, Cláudia Sampaio de Andrade (coorient.) III. Título

572.566

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-084

BRUNNA FERNANDA LIRA PATRIOTA

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MACROALGA *BOTRYOCLADIA
OCCIDENTALIS* (BORGESSEN) KYLIN DO LITORAL DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Morfotecnologia.

Aprovada em 31/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Yara, UFPE (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Juliana Pinto de Medeiros (Examinadora |Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Jane Sheila Higino (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me ter me dado à oportunidade de conhecer e estar rodeada de pessoas maravilhosas que contribuíram direta e indiretamente para que este trabalho fosse terminado.

Aos meus orientadores, professor Ricardo Yara e à professora Cláudia Lima por todo apoio, compreensão, e grande paciência comigo em todas as etapas deste trabalho, e pela indispensável contribuição no entendimento dos resultados e na escrita da dissertação.

Agradeço à professora Cristiane Moutinho que esteve disponível para a realização dos testes de citotoxicidade em cultura de células primárias tão importantes para a conclusão do trabalho.

Ao Dr.º Paulo Soares que se prontificou e contribuiu muito com as análises por RMN do polissacarídeo.

À professora Silene Carneiro e à técnica Maria pela realização do teste citotóxico com as células cancerígenas.

A todos os colegas da primeira turma da pós-graduação da morfotecnologia pela bonita união que tínhamos e pela ajuda mútua nos trabalhos das disciplinas.

Aos colegas do laboratório de biofísica-química, que desde a minha chegada para fazer estágio me receberam de braços abertos, em especial a Natália Onofre, Rafael Quadros, Diogo Gomes, Regina Picasso e Aline Lima pela amizade, carinho e pelos momentos de descontração. A todos do grupo da química (João Paulo, Marília Grasiely, Leylianne, Rafael, Edson Renan, Bia, Cris e Giu) por todo o companheirismo e alegria;

Ao pessoal da Biomol, Juan, Marília Lima, Alice e Bruna pela grande ajuda na técnica da eletroforese; Ao IC, Vinícius Vilas Boas pelo aporte durante a modificação da técnica de Dubois e pela contribuição técnica na bancada;

Agradeço bastante a Rafael Padilha que desde que cheguei ao laboratório me incentivou e ajudou bastante durante os experimentos, por todos os conselhos profissionais e pessoais e pela importante contribuição no desenvolvimento da dissertação;

Aos meus pais, Adeildo José Patriota e minha mãe Maria Lucineide B. de Lira por todo cuidado, estímulo e amor nesses dois anos e aos meus irmãos, Lorena Patriota e Brenno Patriota pelo apreço e por acreditarem desde sempre em mim;

Ao meu namorado\amigo Marcus Vinícius Torreão por sempre me compreender, incentivar a ter mais autoconfiança e a não desistir.

Muito obrigada.

RESUMO

As macroalgas marinhas possuem classes de moléculas bioativas de grande importância industrial e farmacêutica. Dentre estes compostos químicos, destacam-se os polissacarídeos sulfatados como o ágar e carragenanas (ambas galactanas sulfatadas). Diferentes tipos de galactanas, majoritariamente extraídas de algas rodófitas demonstraram atividade citotóxica sobre diferentes tipos de linhagens tumorais. Nas últimas décadas, o câncer é considerado um grave problema de saúde pública, diante disso, este trabalho tem por objetivo extrair e caracterizar polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kytline verificar seu potencial citotóxico e imunológico. Inicialmente, foi realizada uma extração proteolítica no extrato aquoso da macroalga analisada, seguido de sucessivas lavagens com etanol absoluto. A partir de análises como FTIR, RMN, UV-Vis e análise elementar foi possível determinar a estrutura do biomaterial em questão, indicando a presença de galactanas sulfatadas. Foram realizados ensaios com células tumorais, onde foi observada ação citotóxica de 38% para leucemia mielocítica crônica (K-562), 22% para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e 27% para Carcinoma de laringe humana (Hep-2), também foram realizados ensaios com o polissacarídeo extraído em células primárias a partir de um kit contendo citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) que promoveram ação para TNF- α . Diante do potencial biológico desse material, o mesmo pode ser aplicado para a produção de futuros fármacos.

Palavras-chave: Citocinas. *Rhodophyta*. Carragenana.

ABSTRACT

As marine macroalgae they have classes of bioactive molecules of great industrial and pharmaceutical importance. Among these chemical compounds, sulphated polysaccharides such as agar and carrageenan (both sulfated galactans) stand out. Different types of galactans, mostly derived from algae rodófitas demonstrate cytotoxic activity on different types of tumor lineages. The aim of this article is to extract and characterize the sulfated polysaccharides of the red alga *Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kylin and its cytotoxic and immunological potential. Initially, a proteolytic extraction was performed without aqueous extract of the macroalga analyzed, followed by successive washes with absolute ethanol. From analyzes such as FTIR, NMR, UV-Vis and elemental analysis it was possible to determine a structure of the biomaterial in question, indicating a presence of sulfated galactans. We found tumor cell assays with a 38% cytotoxic action for chronic myelocytic leukemia (K-562), 22% for human breast adenocarcinoma (MCF-7) and 27% for human laryngeal carcinoma (Hep-2) we also performed primary cell assays from a kit containing cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ) that promote action for TNF- α . Given the biological potential of this material, it can be applied to the production of future drugs.

Key words: Cytokines. Rhodophyta. Carrageenan.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Exemplares analisados de <i>Botryocladia occidentalis</i> (espécimes de líquido de preservação).....	16
FIGURA 2 -	Representação de aldose (D-glicose) e Cetose (D-frutose).....	18
FIGURA 3 -	Formas isomericamente ativas de monossacarídeos; D-glicose e D-galactose.....	18
FIGURA 4 -	Formação das duas formas cíclicas da glicose: α -D-galactopiranosose e β -D-galactopiranosose.....	19
FIGURA 5 -	Homo e heteropolissacarídeos: (A) polissacarídeo não ramificado e (B) polissacarídeo ramificado.....	20
FIGURA 6 -	Estrutura química de fucoidana isolada de <i>Fucus vesiculosus</i>	23
FIGURA 7 -	Unidades de glicose de laminarina.....	24
FIGURA 8 -	Unidades básicas da ulvana	24
FIGURA 9 -	Representação esquemática e global de galactanas sulfatadas de algas vermelhas.....	25
FIGURA 10 -	Representação esquemática de agarobiose e agaropectina.....	25
FIGURA 11 -	Estruturas químicas de carragenanas.....	27
FIGURA 12 -	Carragenanas: A) Xi (ξ) ; B) Pi(π).....	28
FIGURA 13 -	Família ômega carragenana; A) Omega (ω) carragenana; B) Psi (ψ)-carragenana.....	29
FIGURA 14 -	Esfregaço sanguíneo de um paciente com leucemia mieloide crônica.....	33
FIGURA 15 -	Esfregaço sanguíneo de um paciente com leucemia mieloide crônica.....	34
FIGURA 16 -	Fotomicrografia de Carcinoma de Laringe humano.....	35
FIGURA 17 -	Alga <i>Botryocladia occidentalis</i> (Børgesen)	44

	Kylin.....	
FIGURA 18 -	Painel de extração e caracterização do polímero; A) Extração do polímero; B) Ensaio de Bradford amostra (seta branca), albumina(seta azul); C) Ensaio de Molish amostra (seta branca), glicose (seta azul), somente reagentes (seta verde); D) ensaio fenol- ácido sulfúrico.....	51
FIGURA 19 -	Espectro da região do infravermelho (4000-750cm ⁻¹) das frações polissacarídicas sulfatadas da <i>B. occidentalis</i>	52
FIGURA 20 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida 30% da extração de polissacarídeos da alga marinha vermelha <i>B. occidentalis</i> . 1° canaleta: Amido, 2° canaleta: Agarose; 3° canaleta: Polissacarídeo isolado. 10 µL da amostra juntamente com os padrões foram aplicados ao gel a pH 9 e submetidos a eletroforese a 110 V/cm por 1 hora. Após o gel foi corado em solução de azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%. A descoloração do gel foi realizada com ácido acético 1%.....	53
FIGURA 21-	Espectro de 1H RMN a 500 MHz do polissacarídeo de <i>B. occidentalis</i>	55
FIGURA 22 -	2D ¹³ C/ ¹ H editado HSQC do Polissacarídeo.....	55
FIGURA 23 -	¹ H/ ¹ H 2D TOCSY: Espectros de galactano nativo das algas vermelhas <i>B.occidentalis</i> a 500 MHz, 37 ° C, em D2O.....	55
FIGURA 24 -	Efeitos da viabilidade celular de linfócitos humanos tratados com o polissacarídeo em diferentes concentrações.....	56
FIGURA 25 -	Perfil da produção de TNF-α promovido pelo polissacarídeo em culturas de linfócitos humanos durante 24 horas de ensaio.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA - 1	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ resíduos de α - e β -galactopiranosídeos em galactan nativo extraído de <i>B. occidentalis</i>	54
-------------------	--	----

SIGLAS E ABREVIATURAS

ATR Reflectância Total Atenuada

CBA Cytometric Bead Array/ Citometria de fluxo

DMSO dimetilsulfóxido

INCA Instituto Nacional de Câncer

FTIR Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier

FTC β Fator transformador de crescimento β

HSQC Heteronuclear Single-Quantum Correlation

IFN- γ Interferon -gama

Ig Imunoglobulina

IL Interleucina

LLC Leucemia Linfoide Crônica

mg miligrama

ml mililitro

μ l microlitro

μ m micrômetro

MTT brometo de [3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliol]

NK Células natural Killer

PBMC Mononuclear cells from peripheral blood /Células Mononucleares de Sangue Periférico

RMN Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

SUS Sistema único de Saúde

Th Células T helper

TNF- α Fator de Necrose Tumoral- α

UV-VIS Espectroscopia Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 ALGAS MARINHAS	15
2.1.1 <i>Botryocladia Occidentalis</i>	16
2.2 CARBOIDRATOS	17
2.2.1 Estruturas básicas dos carboidratos	17
2.2.2 Ação biológica dos carboidratos encontrados na natureza	20
2.3 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS VERMELHAS	22
2.3.1 Galactanas sulfatadas de <i>Rhodophytas</i>	24
2.3.2 Atividades biológicas de pls de algas marinhas	29
2.4 CÂNCER	30
2.4.1 Ensaio de citotoxicidade em cultura de células	32
2.4.2 Leucemia mieloide crônica (LMC)	32
2.4.3 Adenocarcinoma de mama	33
2.4.4 Carcinoma de laringe humana	35
2.5 MORTE CELULAR	36
2.6 ENSAIO DE CITOTOXIDADE COM CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS	36
2.6.1 Linfócitos	38
2.6.2 Citocinas	38
2.7 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS	40
2.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho	40
2.7.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	42
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVO GERAL	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAIS & MÉTODOS	44
4.1 COLETA DAS MACROALGAS	44
4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	44
4.3 TESTES PARA CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO	45
4.3.1 Teste de molisch	45

4.3.2 Teste de bradford (doseamento de proteínas totais)	45
4.3.3 Teste do fenol-sulfúrico (dubois)	46
4.3.4 Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	46
4.3.5 Eletroforese.....	46
4.3.6 Análise elementar	47
4.3.7 Espectroscopia por RMN	47
4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO POLISSACARÍDEO EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS	47
4.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO POLISSACARÍDEO SOBRE CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS	48
4.5.1 O Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	48
4.5.2 Cultura de linfócitos e estimulação in vitro com o polissacarídeo	48
4.5.3 Análise da viabilidade celular.....	49
4.5.4 Medição da produção de citocinas.....	49
4.5.5 Análise estatística	50
5 RESULTADOS & DISCUSSÃO	51
5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POR ENSAIOS PRELIMINARES.....	51
5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	52
5.3 ELETROFORESE DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA	52
5.4 ANÁLISE ELEMENTAR.....	53
5.5 ESPECTROSCOPIA DE RESSONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.....	53
5.6 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA FRENTE A CÉLULAS CANCERÍGENAS	56
5.7 CITOTOXICIDADE DO POLISSACARÍDEO EM CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS	57
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A -ARTIGO EM PREPARAÇÃO PARA SER SUBMETIDO À REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES.....	72
APÊNDICE B - AVALIAÇÃO QUÍMICA, ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE MACROALGAS VERMELHAS DO LITORAL PERNAMBUCANO	87

1INTRODUÇÃO

As algas marinhas são organismos eucariontes fotossintetizantes e avasculares, não possuem raízes, folhas, nem sementes e podem ser unicelulares ou multicelulares (OLIVEIRA FILHO, 1981). As macroalgas são classificadas de acordo com sua pigmentação em: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes). Essa coloração é determinada pelos pigmentos acessórios e clorofila, como a fucoxantina nas algas marrons, a ficoeritrina nas vermelhas e clorofila nas algas verdes (COSTA, 2008).

As algas vermelhas são organismos pluricelulares abundantes em águas tropicais mornas (VIDOTTI & ROLEMBERG, 2004), e seus compostos bioativos apresentam alta importância industrial e farmacêutica, sendo que, muitos destescarbohidratosextraídos de macroalgas já apresentaram propriedades anticâncer, a exemplo têm-se os polissacarídeos sulfatados (DELATTRE, FENORADOSOA & MICHAUD, 2011).

As neoplasias são um grande problema de saúde pública atualmente, e é provável que nas próximas décadas 80 por cento de mais de 20 milhões de diagnósticos patológicos sejam associados a algum tipo de carcinoma até o ano de 2025 (INCA, 2016). Novas substâncias com potencial antitumoral como as galactanas extraídas das algas vermelhas *Bostrychia montagnei* e *Porphyra columbina* foram capazes de promover atividade anticâncer frente às células tumorais de cólon uterino- HeLa (STEVAN et al., 2001). Outras classes de polissacarídeos sulfatados, as fucoïdanas, extraídas de *Undaria pinnatifida*, demonstraram ação citotóxica sobre linhagens tumorais humanas de câncer de próstata (PC-3), de cólon uterino (HeLa) e de carcinoma hepatocelular de fígado (HepG2) (SYNYTSYA et al., 2010).

Diante do que foi explanado, é evidente a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos que promovam o tratamento contra o câncer e a redução de tumores, pois grandes avanços na área biomédica são derivados de quimioterápicos e anti-inflamatórios utilizados na clínica provenientes de produtos naturais (MANN, 2002; SHU, 1998). Então o presente trabalho tem por objetivo extrair e caracterizar polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kylin e verificar se estes apresentam atividade citotóxica frente às linhagens celulares tumorais específicas: HEP-2 (carcinoma de laringe humana), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e K-562 (leucemia mielocítica crônica). Além disso, verificar a ação imunológica em células primárias do sangue periférico a partir da produção de citocinas do polissacarídeo extraído.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALGAS MARINHAS

As algas (do latim, *algae*, singular: *alga*) representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e sustentam mais de dois terços da biomassa mundial, sendo responsáveis por aproximadamente metade da atividade fotossintética global (DAY; BENGSON; FLECK, 1999). Elas apresentam uma enorme variedade de formas e dois tipos de reprodução, sexuada e assexuada, podem ser classificadas como bentônicas, quando estão fixas em uma superfície rochosa, ou arribadas, quando estão espalhadas pela praia (SANTOS et al., 2013). De acordo com sua estrutura, a maioria delas apresenta filamentos que crescem a partir de uma única célula apical e se dividem em segmentos a partir de um único eixo, e formam, posteriormente, verticilos de ramos laterais (RAVEN; EVERT; EICHORN, 1996).

As macroalgas são ricas fontes de sais, vitaminas, proteínas, carboidratos, aminoácidos, fibras e antioxidantes. Os polissacarídeos constituintes da matriz extracelular desempenham funções de adaptação ao ambiente, conferindo regulação mecânica, osmótica e iônica (KLOAREG & QUATRANO, 1998).

Elas podem, adicionalmente, ser utilizadas como fertilizantes e servirem de base na indústria de cosméticos e alimentícios, além de apresentarem diversificadas propriedades farmacológicas (VAN; MANN; JANHS; 1989). Em países ocidentais o consumo ainda não é muito expressivo, porém o uso de suplemento alimentar à base de extrato de algas marinhas já é realizado por uma parte da população (CRITCHLEY, 1997; MCHUGH, 2003).

As algas vermelhas, geralmente estão distribuídas desde regiões de clima tropical a frio. Possuem clorofila a e d e pigmentos acessórios em maior quantidade que promovem a coloração avermelhada, que são a ficoeritrina e a ficocianina, localizadas no cloroplasto. A parede celular delas é constituída de celulose e pectinas, e também de galactanas sulfatadas (RAGAN et al., 1994). As algas vermelhas diferem em relação aos vegetais por apresentarem usualmente galactanas sulfatadas como principais constituintes da parede celular na matriz extracelular (PAINTER, 1983).

As algas pardas são macroalgas que têm ampla distribuição no planeta, maior do que as algas vermelhas e verdes. A coloração marrom se dá pela presença de carotenóides e o principal deles é a fucoxantina. São constituídas essencialmente de clorofilas a e c, e de

alguns polissacarídeos como: a celulose, o alginato e as fucanas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

As algas verdes são constituídas basicamente de clorofila a e b, carotenoides, a parede celular é composta de celulose e pectinas, e armazenam amido nos cloroplastos. Apresentam ampla distribuição no ambiente aquático e terrestre, seja em solos úmidos, troncos de árvores ou em simbiose, formando os líquens (RAVEN et al., 2007).

O ambiente marinho possui uma ampla diversidade de organismos que podem oferecer uma gama de estruturas químicas a serem descobertas ainda. Segundo Simões et al. (2002), os metabólitos presentes em fontes marinhas apresentam estrutura e grupos funcionais diferentes dos que têm nas plantas.

2.1.1 *Botryocladia Occidentalis*

O gênero *Botryocladia* as espécies *B. botryoides* e *B. occidentalis* e *B. canariensis*, foram descritas em detalhes por Afonso-Carrillo & Sobrino (2003) a partir do material coletado nas Ilhas Canárias. Este trabalho tornou-se referência, pois esclareceu as diferenças vegetativas e reprodutivas das duas espécies inicialmente citadas, além de descrever uma terceira. Este trabalho também confirma a ocorrência de *B. occidentalis* no Atlântico Leste. Em relação à morfologia, *B. occidentalis* (Figura 1) difere de *B. botryoides* principalmente por suas paredes mais finas de vesículas de três camadas e pelo fato de que suas células secretoras são suportadas exclusivamente em células medulares não modificadas.

Figura 1-Exemplares analisados de *Botryocladia occidentalis* (espécimes de liquido de preservação)



Barra = 10mm

Fonte: AFONSO-CARRILLO & SOBRINO (2003).

Wilkes, McIvor & Guiry (2006) realizaram o sequenciamento de 1.227 pares de bases do gene cloroplastical *rcbL* de 35 espécies diferentes e concluíram que o gênero *Botryocladia* era polifilético e que a espécie *B. boergesenii* deveria ser transferido para o gênero *Irvinea*. Os mesmos autores concluem que *B. occidentalis* se agrupa no gênero *Botryocladia*.

Segundo a biblioteca virtual ALGAEBASE (2017), espécies desse gênero foram encontradas em diversas regiões do globo: América do Norte (Flórida, Norte da Carolina, Texas), América Central (Costa Rica), ilhas do Oceano Atlântico (Bermuda, Ilhas Canário), Ilhas do Caribe (Bahamas, Barbados, Cuba, Porto Rico, Trindade e Tobago), América do Sul (Brasil e Colômbia) e Ilhas do Pacífico (Nova Caledônia).

Vários constituintes químicos já foram identificados em algas desse gênero: α -caroteno, β -caroteno, α -tocoferol (Sousa et al., 2008), contudo a espécie *Botryocladia occidentalis* é conhecida na literatura pela ação biológica dos seus polissacarídeos sulfatados (GOMES, 2006).

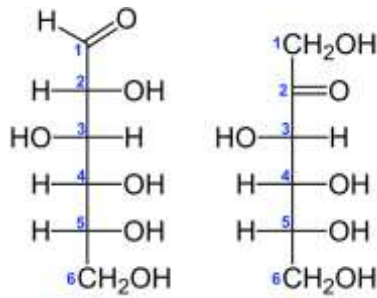
2.2 CARBOIDRATOS

2.2.1 Estruturas básicas dos carboidratos

O termo carboidrato foi definido no século XIX e estava relacionado aos compostos representados pela fórmula geral $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Atualmente o termo é atribuído a quaisquer polidroxialdeídos ou poli-hidroxicetonas que formam estes compostos quando hidrolisados são constituídos fundamentalmente por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (LEHNINGER, 1991).

Existem três classes principais de carboidratos: os monossacarídeos, os dissacarídeos e os polissacarídeos. Os monossacarídeos ou açúcares simples são formados de uma única unidade de polidroxialdeído ou poli-hidroxicetona apresentando de 3 a 7 carbonos e geralmente possuem sabor adocicado. Podem ser classificados quanto a posição do grupo carbonil em aldose (posicionado nas extremidades) e cetose (posicionado fora das extremidades) (NELSON & COX, 2011) (**Figura 2**).

Figura 2-Representação de aldose (D-glicose) e cetose (D-frutose)



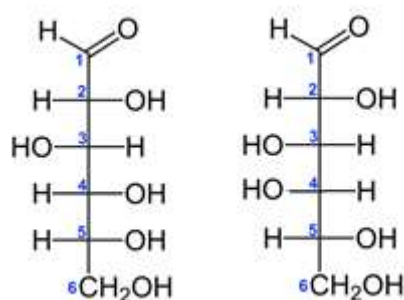
D- GLICOSE D-FRUTOSE

Fonte: Arquivo pessoal (2017)

Os monossacarídeos podem ser classificados também quanto ao número de átomos de carbono: triose (3 carbonos), tetrose (4 carbonos), pentose (5 carbonos) e hexose (6 carbonos) (NELSON & COX, 2011; LEHNINGER, 1991).

Todos os monossacarídeos, com exceção do diidroxiacetona, contêm um ou mais átomos de carbonos assimétricos e ocorrem em formas isoméricas opticamente ativas, chamadas de D (Dextrógira) ou L (Levógira), porque desviam o plano da luz polarizada para a direita ou esquerda, respectivamente. O monossacarídeo mais abundante na natureza é uma hexose conhecida como D-glicose, sendo a D-galactose encontrada frequentemente em rodófitas (LEHNINGER, 1991)(Figura3).

Figura 3-Formas isomericamente ativas de monossacarídeos; D-glicose e D-galactose



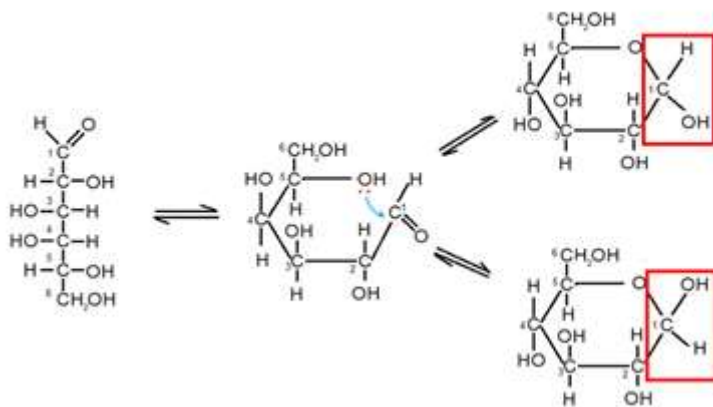
D-GLICOSE D-GALACTOSE

Fonte: Arquivo pessoal (2017)

Em solução aquosa os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono apresentam forma cíclica (ou em forma de anel), formando derivados hemiacetais ou hemicetais. Da mesma forma que na D-glicose o grupo hemiacetal da D-galactose do grupo hidroxil livre do C-5 reage com o C-1 do aldeído gerando o carbono assimétrico e produzindo

dois estereoisômeros designados α e β , com forma de barco ou cadeira. Os compostos com anéis de 6 membros são chamados piranoses, pois se assemelham ao pirano (LEHNINGER, 2002) (**Figura 4**).

Figura 4- Formação das duas formas cíclicas da glicose: α -D-galactopiranosose e β -D-galactopiranosose



D-GALACTOSE

β -D-GALACTOPIRANOSE

Fonte: Nelson & Cox (2011)


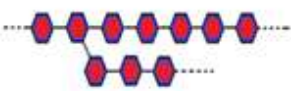

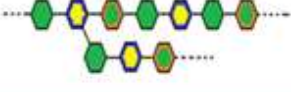
Os dissacarídeos são formados pela ligação de unidades de monossacarídeos (2 a 6) unidas entre si por ligações glicosídicas e são considerados como oligossacarídeos. Três importantes exemplos de oligossacarídeos são os dissacarídeos lactose (D-glicose + D-galactose), maltose (D-glicose + D-glicose) e a sacarose, ou açúcar da cana, o qual consiste de dois monossacarídeos, D-glicose e D-frutose, (LENINGHER et al., 2002).

Já os polissacarídeos são polímeros de origem natural e podem ser constituídos por mais de 20 unidades de monossacarídeos, possuindo até centenas ou milhares de unidades. Alguns, como a celulose, ocorrem em cadeias lineares, enquanto outros, como o glicogênio, têm cadeias ramificadas. Os polímeros de açúcares simples como a glicose, apresentam três funções principais: reserva energética, componentes estruturais de parede celular tanto em bactérias como de plantas e atuam no reconhecimento extracelular, ligando-se a proteínas (NELSON & COX, 2011). Alguns polímeros mais curtos acoplados às proteínas de membrana atuam como sinalizadores celulares específicos (NELSON & COX, 2011).

Os polissacarídeos diferem-se uns dos outros, em relação às unidades de monossacarídicas repetidas. Os homopolissacarídeos contêm somente uma unidade monomérica, enquanto que os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes,

estes ainda podem se apresentar na forma ramificada ou linear (NELSON & COX, 2011) (Figura 5).

Figura 5- Homo e Heteropolissacarídeos: (A) polissacarídeo não ramificado e (B) polissacarídeo ramificado

Quanto a variedade de unidades monoméricas	Presença de ramificações	
	Lineares	Ramificados
Homopolissacarídeo		
Heteropolissacarídeo		

Fonte: Arquivo pessoal (2017)

2.2.2 Ação biológica dos carboidratos encontrados na natureza

De acordo com as propriedades físico-químicas desses polímeros como, peso molecular, grau de ramificação e a composição da cadeia, esses polímeros demonstraram atividade antitumoral porque alteram e estimulam a resposta imunológica contra os tumores (SOMENSI, 2014; GADELHA et al, 2001; BOHN & BEMILLER, 1995). Os polissacarídeos de algas verdes promovem atividade imunológica através da ligação aos receptores do complemento 3 (CR3, CD11b\CD18) de células natural Killers (NK) e de fagócitos (DABA & EZERONYE, 2003; ROSS et al, 1999), tem-se também a intensificação do co-fator de heparina II como outra forma de ação imunológica (Hayakawa et al, 2000; Silva, 2008).

Na estrutura do polissacarídeo, a existência de radicais amino, carboxila ou sulfato determinam o tipo de carga iônica existente, como neutra, positiva ou negativa. Além disso, o tipo de radical presente no arcabouço do polissacarídeo é associado há importantes atividades farmacológicas como, anti-inflamatórias e antioxidantes (MELO, 2003; MARGARITIS & PACE, 1985). Os que possuem o sulfato como o principal radical são chamados de

polissacarídeos sulfatados, e estão presentes em tecidos animais, pepinos do mar, ouriços e macroalgas. As carragenanas e agaranas, encontradas em macroalgas vermelhas, e as fucanas, em algas feófitas, são classes de polissacarídeos sulfatados que têm atividade anticoagulante e antitrombótica já relatada e são utilizadas na indústria farmacêutica (JIAO et al., 2011).

A celulose, formada por unidades de D-glicose com ligações $\beta(1-4)$, é o principal polissacarídeo estrutural presente nas plantas, responsável por proporcionar consistência, firmeza, flexibilidade e por proteger a membrana celular contra a turgidez e a ruptura. A estrutura da celulose é sintetizada pela enzima UDP-glicose celulose sintase, o precursor UDP-D-glicose serve para alongar a cadeia de celulose em crescimento e para promover a estagnação das moléculas de celulose no espaço extracelular (LEHNINGER, 2011). Na parede celular das plantas também são encontrados polissacarídeos neutros associados a pectinas que são as galactanas, arabinogalactanas e arabinanas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Em plantas e outros vegetais, o principal polissacarídeo de reserva é o amido, composto de monômeros de α -D-glicose, na estrutura do polímero também se encontra a amilose, que é um polissacarídeo linear, e a amilopectina, polissacarídeo de estrutura ramificada. Vale salientar também a inulina, que é outro tipo polissacarídeo de reserva dos vegetais. Nos seres humanos, ela é utilizada como probiótico, em razão de não ser digerida pelas enzimas intestinais. Quimicamente, a inulina é formada por cadeias de frutose com um grupo glicose terminal (MANO & MENDES, 2011).

Os peptideoglicanos, ou mureínas, são os heteropolissacarídeo presentes na parede celular de procariontes, são responsáveis por dar forma à bactéria, por proteger a célula da pressão osmótica e por favorecer mais rigidez à parede celular. São formados por dois polissacarídeos, N-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (Mur2Ac) unidos e alternados através de ligações glicosídicas ($\beta(1-4)$), ainda, as extremidades livres dos oligopeptídeos de N-acetilmurâmico (Mur2Ac) são ligados a L e D- aminoácidos (LEHNINGER, 2011). Os exopolissacarídeos são outra classe de polissacarídeos presentes na superfície da parede celular das bactérias, que promovem proteção mecânica, fixam e impedem a perda de micronutrientes pela célula, além da importância na arquitetura do biofilme e adesão à outras bactérias e ao hospedeiro (LAUDARES et al., 2010).

Em relação à ação imunológica de polissacarídeos, estes são capazes de interagir com o sistema imunológico para regular ou minimizar aspectos específicos da resposta do hospedeiro, durante a ação imunológica, são classificados como imunomoduladores ou

modificadores de resposta biológica. Os imunomoduladores de polissacarídeos podem aumentar ou suprimir as repostas imunes, para tal, a via de administração, a dose e o momento da administração influenciam na ação (TZIANABOS, 2000).

Geralmente os polissacarídeos são considerados antigênicos clássicos independentes de células T que não provocam respostas imunes mediadas por células. A maioria dos polissacarídeos bacterianos provocam imunidade humoral que resulta na indução de imunoglobulinas IgM e baixa resposta de afinidade para alguns anticorpos IgG (TZIANABOS, 2000).

Nas fucoïdanas, já foram demonstrados que estes polissacarídeos são capazes de estimular a proliferação *in vitro* de fibroblastos dérmicos e deposição da matriz extracelular. A partir da análise de uma fração de fucoïdana de 16KDa foi evidenciado que o mesmo foi capaz de minimizar a atividade de elastase de leucócitos humanos, resultando na proteção de fibra elástica de pele humana contra a proteólise enzimática. A fucoïdana sugere ainda que possa ser usado no tratamento de patologias inflamatórias em que a matriz extracelular não é controlada e a degradação ocorre (SENNI et al., 2006).

2.3 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS VERMELHAS

Os polissacarídeos sulfatados (PLS) são macromoléculas compostas por várias unidades monossacarídicas repetidas, são ricos em grupos hidroxila, e alguns dos grupos hidroxilas são substituídos pelos grupamentos sulfato (PÉREZ-RECALDE et al., 2014). Estes biopolímeros apresentam ampla distribuição na natureza e estão presentes na matriz extracelular mucilagínosa das algas e têm como principais funções: proteger a alga contra a desidratação em períodos de maré baixa, e também de promover maior flexibilidade e rigidez ao talo contra forças mecânicas (DAVIS, VOLESKY & MUCCI, 2003). As algas marinhas são os organismos que apresentam uma maior quantidade de PLS que apresentam propriedades biológicas.

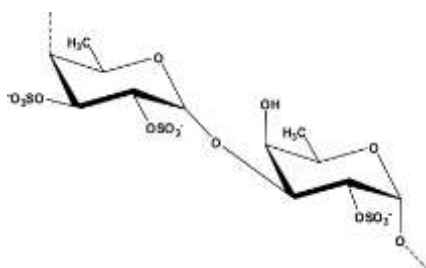
Por causa das propriedades reológicas, a capacidade de formar géis e a solubilidade em água dos polissacarídeos sulfatados, são muito utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e biotecnológica, como geleificantes, estabilizantes e espessantes: em alimentos lácteos, gelatinas, também em molhos para saladas, como excipiente em

medicamentos e para aumentar a viscosidade em meios de cultura utilizados na microbiologia (RASMUSSEN & MORRISSEY, 2007; PRAJAPATI et al., 2014).

As algas verdes (Chlorophyta) possuem PLS em maior quantidade e apresentam compostos com unidades de D-manose e galactose, classificados como arabino-galactanas (PERCIVAL & MACDOWELL, 1967).

Os PLS encontrados em paredes celulares de algas marinhas pardas (Phaeophyta) possuem como carboidrato mais representativo a: α -L-fucose, e são conhecidas como fucanas (PANTANKAR et al., 1993), (**Figura 6**). As fucanas sulfatadas ou fucoïdanas são polissacarídeos bastante encontrados em algas, ouriços e pepinos do mar e apresentam dois tipos de cadeia de homofucose com resíduos de L-fucopiranosil repetidos ou resíduos de L-fucopiranosil alternados (LI et al., 2008).

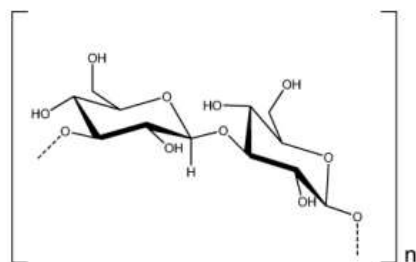
FIGURA 6- Estrutura química de fucoïdana isolada de *Fucus vesiculosus*



Fonte: Pangestuti & Kim (2011)

A laminarina é um PLS encontrada nos gêneros *Laminaria*, *Saccharina*, *Ascophyllum*, *Fucus* e *Undaria*. O conteúdo polissacarídeo varia de acordo com a sazonalidade e habitat, sendo que o mesmo pode atingir até 32% do peso seco. A laminarina não geleifica ou forma qualquer solução viscosa e sua aplicação estende-se ao uso médico e farmacêutico (KRAAN, 2012). As formas solúveis e insolúveis da laminarina são influenciadas principalmente pelo tipo de ramificação (KADAM, TIWARI & O'DONNELL, 2015). A Laminarina é um PLS encontrado em feófitas de baixo peso molecular e é constituído de resíduos de β -Glicose (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 6) (**Figura 7**)

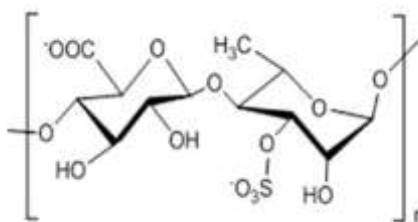
Figura 7- Unidades de glicose de laminarina



Fonte: VERA et al.(2001).

Ulvana é uma designação derivada dos termos ulvacina e ulvina introduzidos por Kylin em referência a diferentes frações da *Ulva lactuca* solúveis em água. Ulvanas são polieletrólitos sulfatados, compostos principalmente formados de ramnose, ácido urônico e xilose (**Figura 8**) (KRAAN, 2012).

Figura 8-Estrutura básica da ulvana



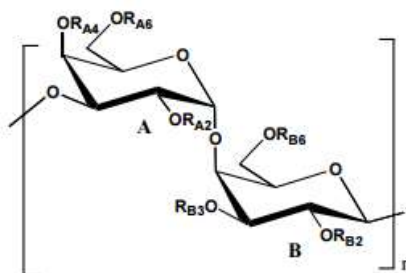
Fonte: WANG, WANG & GUANG (2012)

2.3.1 Galactanas sulfatadas de *Rhodophytas*

As algas marinhas vermelhas (Rhodophyta) possuem galactose como seu monômero majoritário, e contém polissacarídeos sulfatados definidos como galactanas, carboidratos abundantes em D-galactose(COSTA et al., 2014; MANDAL et al., 2008). Vale salientar que as estruturas químicas dos polissacarídeos sulfatados diferem de espécie para espécie e por vezes em diferentes partes na mesma alga (DIETRICH et al., 1995).Quando as galactanas são extraídas de agarófitas e carragenófitas, são classificadas como agaranas e carragenanas, respectivamente (ESTEVEES et al., 2000). Adicionalmente, foi descoberto um terceiro grupo de galactanas denominado, híbridos-D/L (STORTZ & CERZO, 2000) ou carrágar (CHOPIN et al., 1999).

As galactanas sulfatadas de Rhodophytas são polissacarídeos que apresentam unidades repetitivas de ligações β (1-3) galactopiranosose e α (1-4) galactopiranosose (RODRIGUES & FARIAS, 2008) (**Figura 9**)

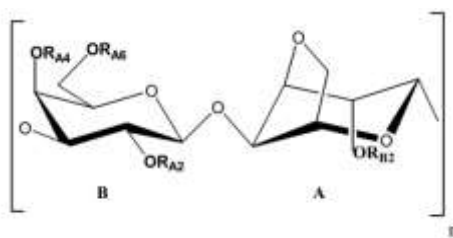
Figura 9- Representação esquemática e global de galactanas sulfatadas de algas vermelhas.



Fonte: DELATTRE, FENORADOSOA, MICHAUD (2011).

O ágar é uma galactana que é formada por um conjunto complexo de polissacarídeos de dois polímeros principais a agarose linear com poder para formação de géis e agarpectina (**Figura 10**) um polímero sulfatado com baixo poder gelificante.

Figura 10- Representação esquemática de agarobiose e agarose.



Fonte: DELATTRE, FENORADOSOA & MICHAUD (2011)

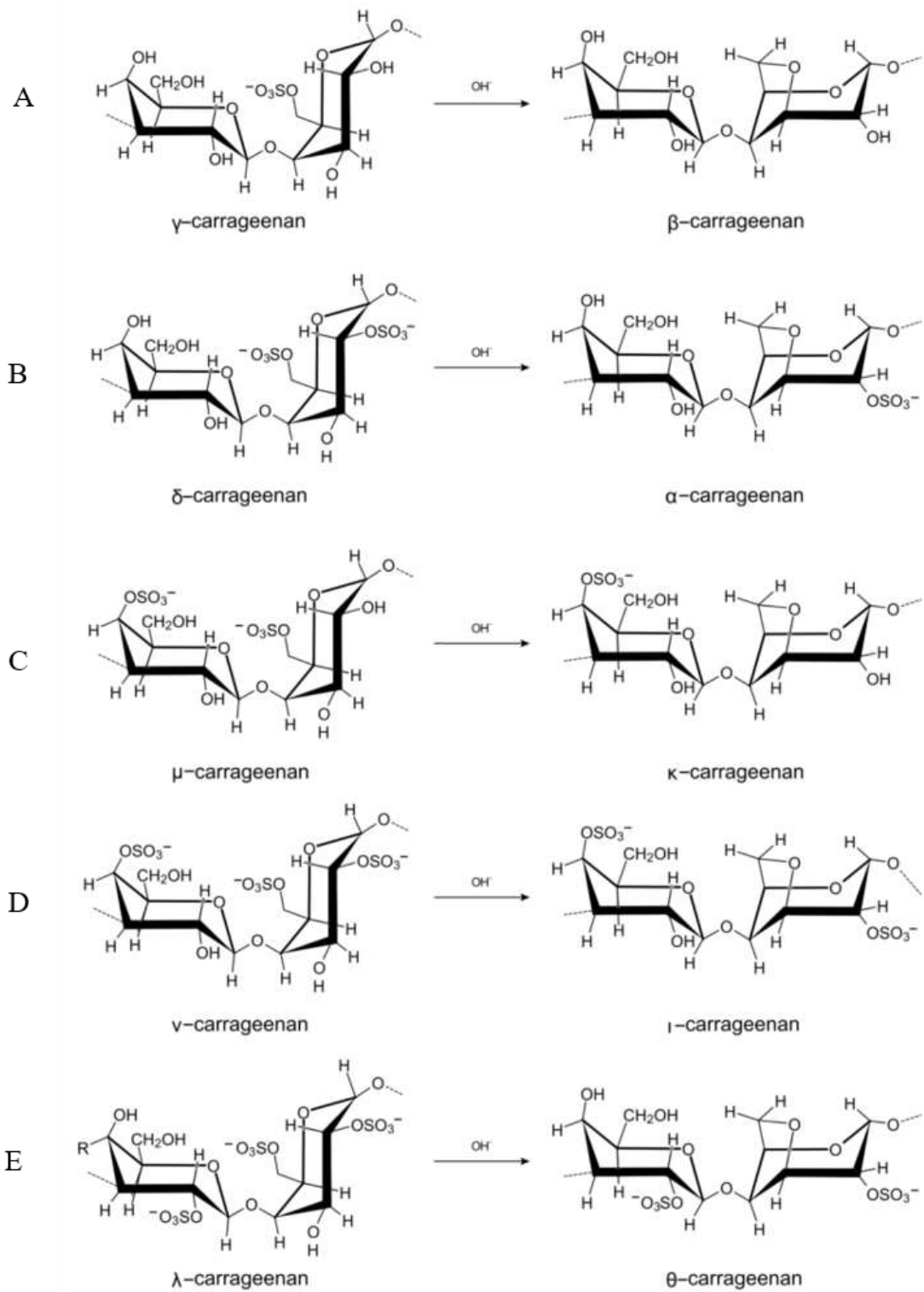
As carragenanas são galactanas lineares formadas por resíduos de D-galactose α -(1,4) e β -(1,3) que estão ligados alternadamente. A unidade de repetição é comumente chamada de carrabiose e os resíduos de galactose α -(1,4), denominada unidade A, ocorrem geralmente como 3,6 anidro-D-galactose. Grupos de ésteres sulfatados são encontrados em todas as galactoses, quanto mais elevados o grau de sulfatação maior o nível de solubilidade e menor resistência ao gel. (DELATTRE, FENORADOSOA e MICHAUD, 2011). O primeiro relato do uso da carragenana está relacionada à cidade de Carragheen, próxima ao condado de Waterford, ao Norte da Irlanda, onde as algas eram utilizadas para aumentar a viscosidade do

leite consumido pela população, sendo batizada inicialmente de carrageen ou irish moss (Pereira, 2004).

O conteúdo e distribuição dos grupos éster sulfato nessas moléculas são responsáveis pelas diferenças primárias entre os diversos tipos de carragenanas. A proporção dessas diferentes frações também varia em função da espécie, do habitat e da época da colheita das algas. Inicialmente, as carragenanas foram subdivididas em duas famílias, em função da sua solubilidade em KCl (cloreto de potássio). As frações solúveis foram designadas pelo prefixo Kappa (κ), enquanto que as insolúveis foram chamadas de Lambda (λ) (PEREIRA, 2004).

Mais tarde, as classificações foram baseadas no número, na posição dos agrupamentos sulfatos e na presença de pontes 3',6'-anidro nos resíduos D-galactopiranosídios. Isso levou a criação de sub-famílias (**Figura 11**). O primeiro grupo que forma géis foi definido como a família Kappa e incluiu carrageninas iota (ι) (**Figura 11D**) e kappa (κ) (**Figura 11C**) bem como seus precursores: os carragenatos X (μ) e Y (ν) respectivamente (ANDERSON et al., 1973). Campo et al (2009) designa X e Y como “mu” e “nu” carragenana respectivamente. Todos os membros desta família são sulfatados na posição C4 da unidade A. As principais diferenças entre as subfamílias κ e ι é uma unidade B sulfatada C2 no caso de ι , além de um maior teor de 3,6-anidrogactose (28-35%) para κ carrageninas em comparação com ι um (25-30%). As formas precursoras das subfamílias κ (μ) e ι (ν) apresentaram as mesmas características, exceto a presença de resíduos de 3,6-anidrogactose substituídos por uma unidade B sulfatada 6-O (DELATTRE, FENORADOSOA e MICHAUD, 2011).

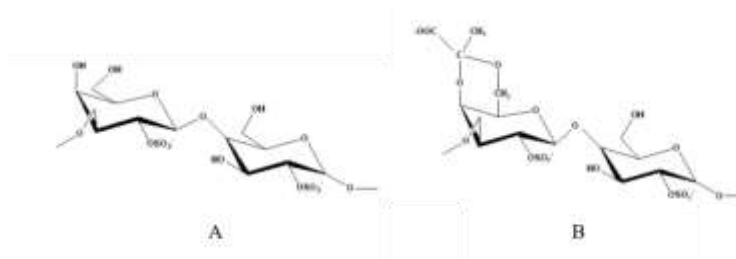
Figura 11- Estruturas químicas de carragenanas



Fonte: NECAS & BARTOSIKOVA (2013)

A segunda família, chamada λ carragenina, não é sulfatada na posição C4 da unidade B e não apresenta 3,6-anhidrogactopiranosose. Trata-se da carragenana mais sulfatada com 3 grupos de sulfato por unidade de repetição. Estes sulfatos estão localizados na unidade C2 de A e em unidades C2 e C6 de B (**Figura 11E**). Este polissacarídeo com carga altamente aniônica possui propriedades espessantes, mas não gelificantes (REES, 1969; GREER e YAPHE, 1984). A família λ contém subfamílias incluindo xi (ξ) (**Figura 12A**), theta (θ) (**Figura 12E**) e pi(π)(**Figura 12B**)carrageenanas, onde apenas a unidade de 4- α -Dgalactopiranosose varia. A estrutura theta possui uma unidade B somente sulfatada na posição C2 (**Figura 11E**). Foi obtido por transformação alcalina lenta da carragenina lambda (CIANCIA et al., 1993). Esta estrutura também foi detectada naturalmente presente em algas como *Callophyllis hambroniana*(MILLER, 2003; FALSHAW et al., 2005). As outras estruturas desta família como ξ carragenana desulfatada (**Figura 12A**) (PENMAN e REES, 1973) e carragenana π piruvado (**Figura 12B**) (DiNINNO et al., 1979) foram observadas em tetrasporófitos de diferentes espécies de Gigartinaceae (McCANDLESS et al., 1983; FALSHAW e FURNEAUX, 1995, FALSHAW e FURNEAUX, 1998).

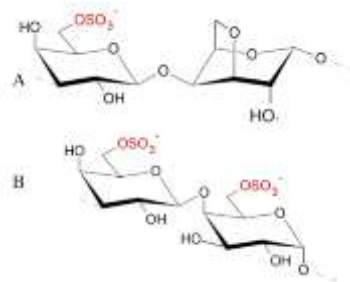
Figura 12-Carragenanas: A) Xi (ξ); B) Pi(π)



Fonte: DELATTRE, FENORADOSOA, MICHAUD (2011).

A terceira família Beta (β): não apresenta sulfatação nas unidades A e divide-se em Beta (β -), Alfa (α)-carragenanas e suas precursoras biológicas, Gamma (γ -) e Delta (δ)-carragenana (**Figura 11A e 11B** respectivamente), a quarta família, Omega (ω), apresenta sulfatação no C-6 das unidades A e divide-se em ω -carragenana e sua precursora biológica Psi (ψ)-carragenana (**Figura 13A e 13B** respectivamente)(CORDEIRO, 2014).

Figura 13-Família ômega carragenana; A) Omega (ω) carragenana; B) Psi (ψ)-carragenana



Fonte:Cordeiro (2014).

2.3.2 Atividades biológicas de pls de algas marinhas

Na literatura científica foram relatados diversos PLS que apresentam ações biológicas tais como: atividade antitumoral (SOEDA et al. 1994), antiproliferativa (McCAFREY et al., 1992), antiadesiva (LEY; CERRITO; ARFORS, 1991), antiangiogênica (LINHARDT & TOIDA, 1997), antiaterosclerótica (ENGELBERG, 1991) e antimetastática (ZACHARSKI & ORNSTEIN, 1998) além de ter sido esclarecido o metabolismo da L-galactose, um de seus principais componentes (MOURÃO & ASSREUY, 1995).

As propriedades biológicas mais destacadas nas algas marinhas são ações anticoagulante e antitrombótica, que foram estudadas focalizando a substituição da heparina (MOURÃO & PEREIRA, 2000). Farias e colaboradores (2000) descreveram que duas frações (F2 e F3) da D-galactana sulfatada extraída da alga *Botryocladia occidentalis* são polissacarídeos anticoagulantes, pois aumentam a inibição da trombina e do fator X da coagulação na presença de antitrombina e/ou cofator II da heparina. Foi também determinado que o conteúdo de sulfato destas moléculas é importante para a ação anticoagulante, uma vez que galactanas dessulfatadas perdem esta atividade.

A heparina, um polissacarídeo altamente sulfatado, apresenta alguns efeitos colaterais no seu uso clínico, tais como a ineficácia para alguns pacientes com deficiência de antitrombina, complicações hemorrágicas e trombocitopenia (WEITZ, 1994).

Os PLS também têm demonstrado importantes efeitos na inibição da replicação de vírus, inclusive alguns patógenos humanos como o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), herpes simples, citomegalovírus e o vírus da dengue (WITROUW et al., 1994; DAMONTE et al., 1996). O vírus humano herpes simples tipo 1 (HSV1) é largamente

difundido no mundo, podendo causar várias doenças e ameaçar a vida de indivíduos imunossuprimidos como pacientes transplantados ou com HIV (LEVIN, 1993; STEWART et al., 1995).

Em indivíduos resistentes ao acyclovir (ACVR-HSV), foi realizado um estudo das atividades antivirais de extratos aquosos das algas verdes (*Ulva fasciata* e *Codium decorticatum*), pardas (*Padina gymnospora*, *Laminaria abyssalis* e *Sargassum vulgare*) e vermelhas (*Pterocladia capilaceae*, *Hypnea musciformis* e *Vidalia obtusiloba*), provenientes da costa do Rio de Janeiro-Brasil. Tais extratos mostraram-se efetivos e com baixa toxicidade. O efeito mais significativo foi verificado na alga *Laminaria abyssalis*, que inibiu o vírus cerca de 100% em baixas concentrações de extrato (1,2% p/v) (SANTOS et al., 1999).

Foi também verificado que os PLS também apresentam efeito antinociceptivo em camundongos. Tal atividade foi demonstrada por Vieira e colaboradores (2004) para polissacarídeos totais extraídos da alga *Bryothamnion seaforthii*, uma alga vermelha comum no litoral do Ceará.

Tissot e colaboradores (2003) descreveram que frações de uma fucana extraída da alga parda *Ascophyllum nodosum*, apresentam efeito inibitório in vitro sobre o consumo das proteínas C2, C4 e em menor grau de C3 com pouca ou nenhuma atividade anticoagulante. Ou seja, este polissacarídeo sulfatado tem a vantagem de inibir a ativação da via clássica do sistema complemento, evitando assim sua amplificação, por produção de peptídeos pró-inflamatórios. Estes dois trabalhos sugerem que, as fucanas têm, portanto, grande potencial farmacológico podendo ser utilizados na terapia anticomplemento e anti-inflamatória atuando na prevenção de danos teciduais ou apresentando algum provável papel no transplante de órgãos ou biomateriais.

2.4 CÂNCER

O Câncer é um problema de saúde pública a nível mundial, e muito se tem investido em medicamentos na busca de novos agentes antitumorais. O câncer pode ser adquirido quando uma célula normal através da alteração genéticas provocam alterações na síntese de proteínas conferindo perda ou ganho de sua função biológica (BELIZÁRIO, 2002). De uma

forma geral, resulta numa desordem genética a partir de mutações que controlam a multiplicação celular (AMORIM, 2002).

O tumor é um conjunto de células que resulta em uma divisão anormal do tecido, e podem ser classificados como benignos ou malignos. Os tumores malignos podem se propagar gerando metástases, devido ao fato das células na corrente sanguínea atingirem outros órgãos (AMORIM, 2002). Algumas interações célula-célula e célula-matriz podem agir diretamente na formação e disseminação de alguns tumores e certa cascata bioquímica levam células tumorais a se desprender de células vizinhas ocasionando a metástase (BELIZÁRIO, 2002).

O Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), publicou em seu site algumas estimativas da incidência de câncer para os anos de 2016-2017, segundo o INCA o câncer de maior incidência, com exceção do de pele não melanoma, é o de próstata seguido de traqueia, brônquio, pulmão nos homens e mama colorretal e colo de útero nas mulheres. Neste trabalho foi realizada a pesquisa e estudo das seguintes linhagens: leucemia mieloide crônica, adenocarcinoma de mama e carcinoma de laringe humana (INCA, 2017).

Para o tratamento do câncer, estima-se que o uso de sondas moleculares, com ajuda da bioinformática e a combinação de novos agentes antitumorais podem atuar em diferentes alvos sejam enzimas quinases, receptores, e fatores de transcrição bloqueando e restabelecendo algumas das vias metabólicas (BELIZÁRIO, 2002). Em relação às opções de tratamentos, existem várias drogas e terapias para o tratamento do câncer. No entanto, quase todos os medicamentos e quimioterapias causam vários efeitos colaterais. A pesquisa em novas macromoléculas biológicas como polissacarídeos que possuem atividade anticâncer poderão contribuir no arsenal terapêutico ou até mesmo para aumentar a eficácia de drogas convencionais (ZONG, CAO & WANG, 2012).

2.4.1 Ensaios de citotoxicidade em cultura de células

A maioria das células animais podem se multiplicar ou mesmo expressar propriedades diferenciadas em cultura e podem ser observadas a partir de microscopia ou bioquimicamente (ALBERTS et al., 2004), podendo, portanto, ser utilizado para ensaios para avaliar citotoxicidade.

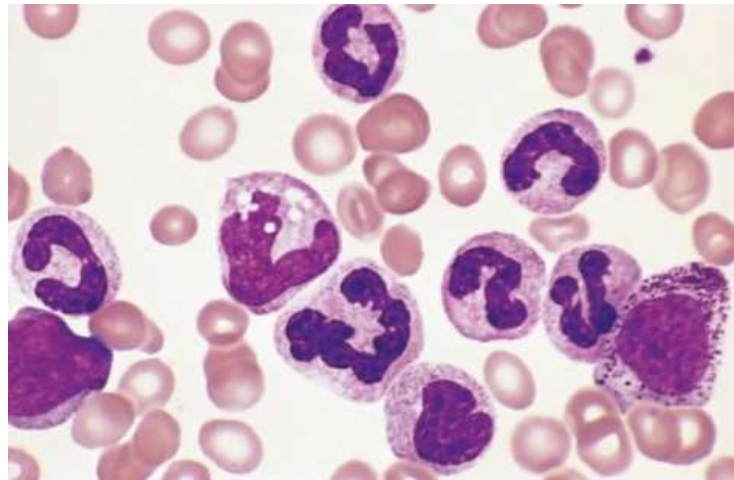
As células tumorais são bastante utilizadas em ensaios de citotoxicidade e podem atuar como modelo de função fisiológica antes de serem testadas em um modelo animal. A atividade biológica de vários biomateriais, entre eles exopolissacarídeos (NGUYEN & NGUYEN, 2014) e metabólitos secundários (WINK, 2015) podem ser testados em células tumorais (ALVES & GUIMARÃES, 2016).

Para análise de um material citotóxico é necessário o uso de MTT (brometo de [3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]). A técnica é bastante simples e baseia-se na redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT. O material em análise age nas células liberando ao meio enzimas mitocondriais resultando em um produto azul (formazan) esse produto é quantificado por espectrofotometria e todas as células vivas que apresentam mitocôndrias ativas são usadas nesse ensaio de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

2.4.2 Leucemia mieloide crônica (LMC)

A leucemia mieloide crônica é uma doença caracterizada por uma proliferação excessiva da linhagem mieloide. Esta pode se manifestar nas seguintes fases: crônica (benigna, apresentando hiperplasia medular, e capacidade de maturação de células mielóides), acelerada (esta fase apresenta resistência a terapia medicamentosa) e blástica (resistente a terapia convencional e costuma ser agressiva permitindo ao doente uma sobrevida muito curta) (INCA, 2003). A leucemia mieloide crônica apresenta leucocitose com acentuada neutrofilia, basofilia, eosinofilia e uma quantidade demasiada de elementos mielóides. (Duarte, 2005) (**Figura 14**), enquanto que a linhagem K-562 são típicos de blastos com diâmetro de cerca de 20µm, não apresentam grânulos e possuem dois ou mais nucléolos.

Figura 14- Esfregaço sanguíneo de um paciente com leucemia mieloide crônica



Fonte: KUMAR; ABBAS; ASTER (2013).

Os pacientes que possuem essa doença apresentam como marcador principal para auxiliar no diagnóstico da doença o cromossomo Philadelphia, ocasionado por uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22. Os testes iniciais realizados com essas células foram de CML-1 e K-562 (LOZIO & LOZIO, 1975).

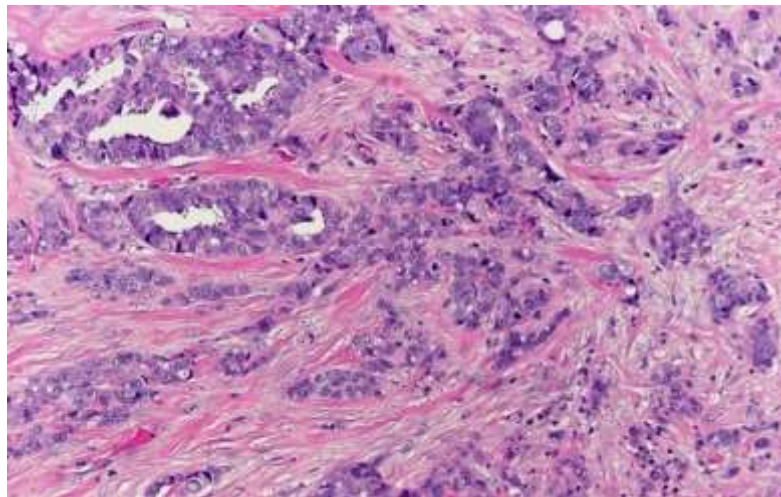
O tratamento anual da LMC depende em sua maioria das vezes do estado físico do paciente. Geralmente o tratamento se dá a partir do FCR (fludarabina, ciclofosfamida e rituximabe), enquanto que para pacientes com idade avançada o clorambucil com ou sem o rituximabe é bastante usada. O sistema público não contabiliza o rituximabe no tratamento desses pacientes. Outros tratamentos ainda são utilizados como o lenalidomida, ofatumumabe e o campath, contudo existe sempre a busca por agentes naturais (HAMERSCHLAK, 2012).

2.4.3 Adenocarcinoma de mama

O câncer de mama atinge na maioria das vezes os ductos mamários, sendo mais comum em mulheres com idade entre 49 e 50 anos. Existem relatos que maioria dos cânceres de mama tem origem genética e 90%-95% deles sejam esporádicos enquanto que mutações somáticas totalizam entre 5% - 10%. O câncer de mama pode ser detectado pelo auto-exame das mamas pela realização de mamografia ou ultrasonografia confirmado por biopsia da lesão. A biopsia deve conter todos os elementos necessários para o adequado manejo clínico. A partir disso realiza-se avaliação imunohistoquímica e hormonal (TRUFFELI et al., 2008). O

tumor mais comum chama-se carcinoma ductal e os que acometem os lóbulos são chamados de carcinoma Lobular (são menos frequentes) (INCA, 2001) (Figura 15).

Figura 15-Fotomicrografia de um corte histológico carcinoma invasivo ductal



Fonte: <http://pathology.jhu.edu/breast/types.php> (Disponível 30/05/2017).

A linhagem MCF-7 foi isolada pela primeira vez em 1970 do tecido mamário de uma mulher caucasiana, curiosamente pelo tecido possuir um epitélio mamário diferenciado. As células apresentam receptores citoplasmáticos de estrogênio e podem processar estradiol. Para contribuir no tratamento de pacientes acometidas pelo câncer de mama, os biomarcadores (ER, PR e o HER-2) são os principais marcadores dosados pelos exames (NALWOGA, 2010). Em mulheres que são portadoras dos genes BRCA1\BRCA2, a mastectomia bilateral é considerada a melhor prevenção ao câncer de mama (PALMERO, 2013).

É mencionado por Barros e colaboradores (2001), que 90-95% dos casos não sejam genéticos, ao mesmo tempo em que, 5-10% dos casos sejam sucessivos na linha familiar. O diagnóstico correto do tipo de tumor deve-se considerar o tamanho, o tipo histológico e a invasão vascular peri-tumoral nos vasos sanguíneos ou linfáticos. O tratamento para o adenocarcinoma de mama é executado por uma equipe profissional multidisciplinar, estando a opção de quimioterapia relacionada a um tratamento sistêmico, ao passo que, a cirurgia e a radioterapia são para tratamento loco-regional.

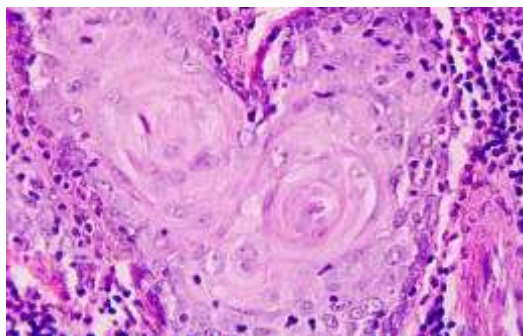
2.4.4 Carcinoma de laringe humana

O câncer de Laringe é uma das neoplasias mais comuns das vias aéreas superiores. Nos últimos anos 20 anos, foi estudada a eficácia dos protocolos de radioterapia e quimioterapia em carcinomas localmente avançados da laringe (CARVALHO, MANNARINI; KOWALSKI et al., 2011). Esta é uma das neoplasias mais frequentes, excluindo os carcinomas encontrados na pele. E costuma aparecer entre os 50 e 70 anos (**Figura 16**) (PARÉ et al., 2009).

A biópsia é obrigatória antes de qualquer procedimento terapêutico, pois a laringe pode abrigar tipos diversos de lesões sejam benignas ou malignas. Para saber qual é o prognóstico do carcinoma de laringe no paciente, tem que se acompanhar através de exames clínicos como estão as taxas dos biomarcadores da doença, além das técnicas por imagem do órgão, importante por propiciar alta taxa de cura e boa preservação do órgão e da voz (RIBEIRO et al., 2015). Além disso, existem outras técnicas como traqueostomia e aspirações (DEDIVITIS et al., 2011).

As células Hep-2 (American Type Culture Collection CCL-23) oriundas de carcinoma de laringe humano, após testes de cultivo em monocamadas sobre lâminas de vidro passaram a ser um ótimo substrato para fonte de auto-antígenos. (DELLAVANCE & ANDRADE, 2012).

Figura 16-Fotomicrografia de Carcinoma de Laringe humano



Fonte: <http://www.wikiwand.com/ca/Neopl%C3%A0sia> (Disponível em 30/05/2017).

2.5 MORTE CELULAR

As células de um organismo precisam de mecanismos de regulação metabólica. À medida que estes mecanismos não são efetivados, ocorre o crescimento celular exacerbado e as células se dividem desordenadamente. Alguns genes são responsáveis pelo estímulo do crescimento de outras células, e caso sofram mutação, servirão de estopim para um crescimento ilimitado e desordenado de outras células e são conhecidos como proto-oncogenes (THÉRIAULT, 1998).

A classificação da morte celular é detectada pela sua aparência morfológica, podendo ser apoptótica, necrótica, autofágica ou associada à mitose de acordo com critérios enzimáticos, aspectos funcionais ou imunológicos (KROEMER et al., 2008).

Na apoptose, ocorre um processo coordenado que, pela maioria das vezes, depende de energia, e um grupo de proteases de cisteína (caspases) é ativado formando uma cascata de acontecimentos onde há uma conexão de estímulos do começo ao fim (ELMORE, 2007). Normalmente ocorre no envelhecimento ou desenvolvimento da célula e na manutenção de populações de células nos tecidos para que haja um mecanismo homeostático, também ocorre como mecanismo de defesa, em reações imunes ou mesmo na eliminação de células prejudicadas por agentes nocivos e doenças (ELMORE, 2007).

No episódio da necrose, a integridade da membrana plasmática é rompida e os conteúdos celulares são degradados por enzimas e liberados (ABBAS; LICHTMAN, 2005). É um processo tóxico em que a célula é uma vítima passiva e morre sem depender de energia (ELMORE, 2007).

A apoptose e a necrose são dois processos que podem ocorrer de forma independente, sequencialmente ou simultaneamente; o que difere é o tipo ou o grau de estímulos, pois muitos estímulos prejudiciais como, radiação, hipóxia, calor e drogas anticancerígenas citotóxicas podem promover apoptose, porém em doses mais elevadas provocam necrose (ELMORE, 2007).

2.6 ENSAIO DE CITOTOXIDADE COM CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS

Existe um controle mais rigoroso sobre o uso de animais de laboratórios e a necessidade de padronizar os testes *in vitro* e detectar dispositivos para uso em humanos. De acordo com a ISO 10993 este ensaio é o primeiro teste quando se quer avaliar a biocompatibilidade de qualquer material em dispositivos biomédicos. E muitos das culturas celulares são padronizadas testes de citotoxicidade (ROGERO et al., 2003).As células em cultivo são demasiadamente utilizadas como modelo de função fisiológica antes do modelo animal. Na proliferação *in vitro* sua adesão celular é reduzida e não apresenta características de um tecido *in vivo*; e este é o modelo mais usado em Comissões de Ética de Uso Animais e Pesquisa (ALVES&GUIMARÃES, 2016).

As culturas primárias são preparadas diretamente dos tecidos de um organismo sem proliferação celular *in vitro* chamada de culturas primárias. Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto(ROGERO et al., 2003).Contudo, as células apresentam algumas desvantagens, entre elas maior dificuldade de obtenção, alto custo, e uma maior possibilidade de contaminação. Quando as células as culturas primárias são removidas da placa e são subcultivada repetidamente durante semanas ou meses são conhecidas como culturas secundárias (ALBERTS et al., 2004).

Ao se remover os glóbulos vermelhos por centrifugação por gradiente de densidade, no sangue periférico além das células polimorfonucleares, as células linfóides e mielóides são fundamentais para uma análise detalhada do sistema imunológico humano. O isolamento de células mononucleares do sangue periférico humano ou PBMC (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) são obtidos através da centrifugação do sangue em soluções comerciais como o Lymphoprep, Ficoll Hypaque ou Percoll que contém polissacarídeos e um composto de alta densidade (diatrizoato de sódio).

OS PBMCs incluem linfócitos (células T, células B e células NK), monócitos e células dendríticas. Nos seres humanos, as frequências dessas populações variam de acordo com os indivíduos. Na ausência de células T ou resposta imune a maior fração das PBMCs isoladas estão principalmente presentes como células T naive ou de memória.

Desta forma, é possível separar células de tipos diferentes conforme a sua densidade por meio da formação de camadas. Após o isolamento das células mononucleares, pode-se fazer a purificação das células presentes de acordo com o tipo desejado sejam linfócitos B,

linfócitos T, células *Natural Killer* (NK) ou monócitos (AROSA; CARDOSO; PACHECO, 2012).

2.6.1 Linfócitos

Os linfócitos são semelhantes na aparência mas variam funcionalmente, este grupo incluem as células T, B e natural Killers. Estas células são responsáveis pela produção de anticorpos, morte celular, e regulação da resposta imune. Os linfócitos são células do sistema imunológico capazes de reconhecer e distinguir especificamente uma grande variedade de antígenos e são responsáveis pela habilidade de memória imunológica e especificidade da resposta imunológica adquirida. Possuem importantes funções como: produção de receptores específicos de alta afinidade para os antígenos, possibilidade da transferência de imunidade contra micro-organismos de pessoas imunizadas para as que não possuem imunidade, produção de respostas *in vitro* através do estímulo de linfócitos em meios de cultura sendo bem semelhantes às respostas *in vivo*, ajuda no diagnóstico de doenças congênitas e adquiridas e de alterações causadas por medicamentos e irradiação por meio da diminuição da quantidade de linfócitos na circulação (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As principais classes de linfócitos existentes são os linfócitos B, que fazem parte da imunidade humoral, sendo ativados e diferenciados em plasmócitos que são capazes de produzir imunoglobulinas, e os linfócitos T, que participam da imunidade celular, onde são ativados para produzir citocinas (BERNE et al., 2000; UNANUE; BENACERRAF, 1986). As células NK (*natural killers*) são linfócitos bem diferentes dos linfócitos B e T por terem receptores distintos e funções de destruição de células tumorais ou células infectadas por vírus, além de desempenhar papel significativo na rejeição de transplantes (CALDER, 1998).

2.6.2 Citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares hidrossolúveis que podem variar de 8 a 30 kDa e são secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa e são mediadoras de várias funções nessas células. Elas podem ser produzidas em resposta a micro-organismos ou outros antígenos que medeiam e regulam reações imunes e

inflamatórias. Diferente dos hormônios as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especificamente por mecanismos autócrinos e parácrinos. A sua secreção costuma ser um evento breve e autolimitado. Abaixo algumas características de citocinas que foram abordados neste trabalho (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

TNF: A principal fonte celular de TNF é constituída essencialmente por fagócitos mononucleares ativados. É o principal mediador da resposta inflamatória aguda contra vários micro-organismos infecciosos, e ainda de causar necrose em tumores *in vivo*. Em graves infecções o TNF pode ser produzido em grandes quantidades causando anomalias clínicas e patológicas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL-2: É um fator de crescimento para linfócitos T estimulado por antígenos e são responsáveis pela expansão clonal de células T após o reconhecimento do antígeno. Alguns dos seus receptores funcionais IL-2 é acentuada por estimulação antigênica, já que as células T reconhecem antígenos são células que proliferam preferencialmente em resposta a IL-2 produzindo respostas imunes adaptativas. São responsáveis pela proliferação de células antígeno-específicas, promove a proliferação e diferenciação de outras células imunes. Esta também potencializa a morte apoptótica de células T ativadas por alguns antígenos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL-4: Esta estimula para produção de anticorpos IgE e para desenvolver células TH2 a partir de células T auxiliares CD4+ naive. Essa interleucina ainda estimula o desenvolvimento de células T CD4+ naive e funciona como um fator de crescimento autócrino para células Th2 diferenciadas. Essa citocina consegue estimular a troca de classe de cadeia pesada da Ig da célula B para o isótipo IgE (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL-6: Esta citocina atua tanto na imunidade inata e adaptativa e é sintetizada por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblasto e outras células em resposta a micro-organismos e outras células. Na imunidade adaptativa a IL-6 estimula o crescimento de linfócitos que se diferenciam em produtores de anticorpos. Ela também é responsável pela síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e contribui para o efeito sistêmico da inflamação na fase aguda (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL-10: A IL-10 é conhecida por ser um inibidor de macrófago e células dendríticas ativadas e está envolvida no controle das reações da imunidade inata e da imunidade mediada por células. Seus efeitos biológicos resultam da sua capacidade de inibir muitas das suas funções dos macrófagos ativados, sendo um excelente exemplo de *feedback* negativo. Ela

também inibe a produção de Il-12 por macrófagos e células dendríticas e inibem a expressão de co-estimuladores e de moléculas MHC da classe II em macrófagos e células dendríticas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

2.7 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS

Após o isolamento de um biomaterial com ação biológica, faz-se necessária a caracterização da estrutura e a partir disso uma gama de testes químicos, cromatográficos e espectroscópicos são necessários.

2.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é um método sensível, rápido e permite a análise da amostra sem a necessidade de hidrólise do polissacarídeo em análise. Vários compostos covalentes sejam orgânicos ou inorgânicos podem absorver radiação eletromagnética na região de infravermelho do espectro (400 a 880nm). O infravermelho também é um método para a determinação dos grupamentos funcionais de uma amostra assim como verifica o tipo de ligação (simples, dupla ou tripla) e é igualmente útil como complemento para verificação de proteínas (contaminantes) nas amostras (SILVA, 2007).

As moléculas quando absorvem na radiação do infravermelho elas se excitam até atingir um estado de maior energia, tornando-se um processo quantizado. O espectro acontece quando a radiação IV incide na amostra e parte da mesma é absorvida, e a energia corresponde as frequências vibracionais de estiramento e dobramento das ligações que em sua maioria são covalentes. A espectroscopia FTIR (Fourier Transform Infrared) é um dos métodos mais utilizados para a identificação para biomateriais entre esses, polissacarídeos. No FTIR uma parte da radiação de infravermelho passa através da amostra enquanto outra parte é absorvida e transmitida. O FTIR foi desenvolvido para superar as limitações encontradas com instrumentos dispersivos. Uma das principais medidas para analisar todas as frequências de infravermelho simultaneamente foi desenvolver um dispositivo óptico chamado

interferômetro. Este aparelho produz um tipo de sinal que possui as frequências do infravermelho codificadas e este sinal pode ser analisado na ordem de segundos.

Esta técnica permite a análise qualitativa de compostos orgânicos que em frequências específicas são influenciadas pela presença de grupos funcionais próximos (RUSCHEL et al., 2014).

O ATR (Reflectância Total Atenuada) é uma técnica de escolha para análise de da superfície de vários polímeros. Esta técnica utiliza um cristal com índice de refração muito elevado e baixa absorção na região do infravermelho. Esta técnica consegue analisar sólidos e líquidos e não precisa existir um preparo na amostra. A profundidade de penetração do feixe depende de diversos fatores entre os quais ângulo de incidência, e índice de refração da amostra. Para que a técnica seja bem-sucedida à amostra deve estar em contato direto com o cristal ATR e o índice de refração da amostra devem ser maiores do que a amostra em análise, por isso é seguro assumir que a maioria dos sólidos e líquidos tem índices de refração muito baixos (SOUZA, 2009).

O resultado do infravermelho é normalmente expresso em comprimento de onda cm^{-1} . Os polissacarídeos apresentam uma grande quantidade de grupos O-H e apresentam bandas largas intensas próximo a região de 3300cm^{-1} e próximo de 1080cm^{-1} pelo estiramento C-O (LEITE, 2008).

2.7.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Uma das formas de caracterizar a estrutura de um material orgânico é a partir da utilização da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

O RMN explora propriedades magnéticas dos núcleos dos átomos. Esse pode nos dar informações sobre os núcleos de hidrogênio assim como é possível determinar o número de cada um dos diferentes tipos de prótons não equivalentes e obter informações a respeito da natureza da amostra e ainda obter informações sobre os núcleos dos carbonos. Os núcleos dos átomos podem ser vistos como pequenos piões carregados que giram em torno do seu eixo gerando o seu próprio campo magnético. Os núcleos que geralmente estão dispostos de forma aleatória sob forte campo magnético se alinham em orientações específicas (LUZYANIN & ABRANTES, 2010). Esta técnica pode ser utilizada em amostras sólidas ou líquidas e o seu preparo é costumeiramente feito a partir de um solvente deuterado (LEAL, 2013).

O princípio da técnica se baseia pelo fato da amostra pode absorver radiação eletromagnética na região em frequências específicas. Algumas moléculas como o ^1H e ^{13}C possuem spin nuclear quantizado por estarem associados a um campo magnético e comportam-se como barras magnéticas. Após essas moléculas estarem submetidas a um determinado campo magnético externo ocorrerá uma interação quantizada entre o spin nuclear e o campo magnético aplicado. Esses núcleos entram em precessão e ocorrem o fenômeno da ressonância (MASSARO, 2005).

Em certa molécula os núcleos de hidrogênio podem estar em regiões de maior ou menor densidade eletrônica e em consequência disso absorvem energias em diferentes frequências com campo magnético constante. Os sinais ocorrerão em diferentes posições no espectro de RMN chamando isso de deslocamento químico. No caso de átomos de hidrogênio a magnitude relativa de sinais é muito importante, mas o que importa não é a altura do pico, contudo a área abaixo deles (MASSARO, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a atividade biológica da fração polissacarídica extraída da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* frente a linhagens celulares tumorais e cultura de células primárias (linfócitos humanos).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização química da fração polissacarídica;
- Caracterização estrutural a partir de FT-IR e RMN;
- Avaliação da atividade citotóxica do polissacarídeo em linhagens tumorais: MCF-7 (Adenocarcinoma de mama humana), K-562 (Leucemia mielocítica crônica) e HEP-2 (Carcinoma de laringe humana);
- Avaliação da atividade citotóxica e a indução da produção de citocinas pró-inflamatórias da fração polissacarídica extraída em linhagens de células primárias de sangue periférico humano.

4 MATERIAIS & MÉTODOS

4.1 COLETA DAS MACROALGAS

A coleta da espécie foi realizada em janeiro de 2013, em maré baixa (0,1-0,2m) na praia de Itamaracá a partir de exemplares arribados na zona entre-marés, após a macroalga foi identificada como *Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kylin (Figura 17) por um especialista na área e foi tombada (nº. 60) na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Figura 17- Alga *Botryocladia occidentalis*(Børgesen) Kylin.



Fonte: Arquivo Pessoal (2017)

A amostra foi conduzida ao laboratório em sacos plásticos, onde a alga foi lavada em água corrente a fim de serem retiradas sujeiras, epífitas e incrustantes calcários, sendo em seguida secadas em estufa com circulação forçada de ar a 45°C. Após esta etapa, o material foi triturado e guardado em recipientes plásticos.

4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Inicialmente, o extrato seco da alga (20g) foi lavado 4 vezes a cada 24h seguidas com acetona para retirar o máximo possível de lipídeos e pigmentos. Após o material estar completamente seco, foi realizada uma reação de proteólise com a enzima papaína, em que, o extrato seco foi hidratado em 40mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM por 6 horas a 60°C. Após esse tempo, a solução foi centrifugada (7060g), e ao sobrenadante foram adicionados 80 mL de etanol gelado e foi observado imediatamente o material se precipitando. Logo após este processo, a solução foi

incubada durante 24 horas a 4°C, o material precipitado foi seco e triturado para serem realizadas as análises (SILVA et al., 2005; BARROSO, 2007).

4.3 TESTES PARA CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO

4.3.1 Teste de molisch

O Teste de Molisch foi usado para confirmar a presença de carboidrato. Para tanto, foi preparada uma solução de 5 µ/ 5mL de polissacarídeo acrescido de 3 gotas de Alfa-naftol a 5%, em seguida foi adicionado 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), sendo acrescentado com o tubo inclinado e lentamente. A ocorrência de um anel roxo indica a presença de açúcares (KASSAKUL, et al 2014).

4.3.2 Teste de bradford (doseamento de proteínas totais)

Para analisar o grau de contaminação proteica de um polissacarídeo, um dos métodos comumente utilizados é a dosagem de proteínas totais feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a quantificação de proteínas nas amostras, inicialmente foi realizada uma curva de calibração utilizando-se a albumina de soro bovino nas concentrações de (1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/ml) em triplicata. Em seguida, em local sem irradiação direta de luz, foram pipetados e homogeneizados em microplaca 20 µl da amostra (padrão) de cada uma das concentrações, 1580 µl de água ultra-pura e por último, 400 µl do reagente de Bradford, o branco foi água + Bradford (1600 µl + 400 µl, respectivamente). Passados 10 minutos para que ocorresse a reação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 595 nm para a plotagem do gráfico e análise do coeficiente de correlação (R). A quantificação de proteínas nas amostras de polissacarídeos foi realizada nas concentrações diluídas e em triplicata de (30; 20; 10; 5 e 2,5 µl) + água ultra-pura (130, 140, 150, 155 e 157,5 µl) e logo após foram adicionados 40 µl do reagente de Bradford às soluções, sempre protegidos da luz. O branco foi Bradford (40 µl) e água ultra-pura (160 µl). Posteriormente foi realizada a leitura da medida das absorbâncias em espectrofotômetro a 595 nm (BRADFORD, 1976).

4.3.3 Teste do fenol-sulfúrico (dubois)

O método baseia-se no fato de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos existirá a formação de produtos com o fenol. Esta mudança de cor é medida na região do visível e é proporcional a quantidade de açúcares presente na amostra. A reação é sensível e de cor estável (VICENTE, 2010).

Para esse teste foi feita uma solução padrão de glicose (D-glicose) nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L, onde foi comparada a fração polissacarídica em análise. Foram preparados 0,5 mL das amostras em 0,5 mL de água destilada, após isso foi adicionado 0,5 mL de fenol a 5% e agitar os tubos vigorosamente. Após agitação, adicionar rapidamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98N) pelas paredes dos frascos e agitar o conteúdo novamente. O cálculo das quantidades de açúcar total foi realizado através de uma curva analítica obtida, com auxílio do software Origin (DUBOIS et al., 1956).

4.3.4 Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais da fração foi realizada utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Agilent Technologies Cary 630 FTIR), módulo ATR. A amostra (10mg) foi prensada contra o diamante usando um grampo de pressão do aparelho. Os espectros de transmissão foram coletados mediante resolução de 8, 4 scans, com uma varredura de 4000 a 750 cm^{-1} sob radiação infravermelha.

4.3.5 Eletroforese

Antes da aplicação das amostras no gel, foi realizado uma reação de metacromasia, em que 10 μl da amostra (1 mg/ml) reagiu com o cresol (5 μl) e com o azul de toluidina (10 μl), o que resultou em uma coloração roxa, o glicerol (10 μl) e o vermelho de cresol foram utilizados para demarcar o trajeto da eletroforese. A aplicação no gel para a verificação das bandas dos polissacarídeos sulfatados foi comprovada através da técnica de eletroforese em gel a base de bis-acrilamida 30% em tampão TBE (pH 9). A corrida foi realizada a 110 V por

60 minutos. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina e desidratado em ácido acético glacial 1% (RODRIGUES & FARIAS, 2009).

4.3.6 Análise elementar

A análise da amostra (2mg) foi realizada em Analisador Elementar CHNS-O modelo EA 1110 (Carlo Erba) na Central Analítica da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3.7 Espectroscopia por RMN

Os espectros de ^1H e ^{13}C foram registrados usando um Bruker DRX 500 MHz com uma sonda de ressonância tripla. Cerca de 10mg de amostra foram dissolvidos em 0,5 ml de D_2O a 99,9%. Todos os espectros foram registrados a 37°C com supressão de HOD por pré-saturação. Os espectros de $^1\text{H}/^1\text{H}$ 2D TOCSY e de correlação heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (HSQC) foram registados utilizando incremento de fase de proporção estados-tempo para detecção em quadratura na dimensão indireta. Os espectros TOCSY foram executados com 4.096×1.024 pontos com um campo de rotação de cerca de 10 KHz e um tempo de mistura de 80 ms. HSQC foram executados com 1.024×512 pontos e impulsos retangulares de fase alternada otimizados globalmente para desacoplamento. Todas as alterações químicas de ^1H foram relativas ao ácido trimetilsililpropiónico externo e ao ^{13}C -metanol, ambos a 0ppm.

4.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO POLISSACARÍDEO EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS

As linhagens neoplásicas MCF- 7 (adenocarcinoma de mama humana), K-562 (leucemia mielocítica crônica) e HEP-2 (carcinoma de laringe humana) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, e mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO_2 , em meios específicos RPMI 1640 (Gibco) e DMEN (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) (Gibco) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Para o repique utilizou-se tripsina/EDTA (0,25%). As células foram plaqueadas numa densidade de $0,3 \times 10^5$ (linhagem em suspensão) e 1×10^4 (linhagem aderida), por poço em placas de 96 poços. As linhagens neoplásicas foram tratadas

com os compostos na concentração final de 50 µg/mL e, em seguida incubadas por 72 horas. Após este período, 25 µL de MTT que, em células metabolicamente ativas será convertido em azul de formazan, foi adicionado, e as células foram reincubadas por 3h. A absorbância foi lida, após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO em espectrofotômetro de placa a 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPadPrism 5.0*. A atividade citotóxica dos compostos de acordo com a escala do National Cancer Institute (NCI), onde os compostos são considerados sem atividade citotóxica quando a inibição percentual se apresenta no intervalo de 1 - 20%, com pouca atividade quando essa percentagem situa-se entre 20 e 50%, atividade moderada quando a inibição é de 50 para 70% e de alta atividade, quando o intervalo de inibição fica entre 70 a 100% (COCCO et al., 2006)

4.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA DO POLISSACARÍDEO SOBRE CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS

4.5.1 O Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Recolheram-se sangue (4mL) de 6 voluntários saudáveis jovens (23 a 38 anos), sem doença infecciosa recente, imunossupressão e/ou doença autoimune em tubos de heparina (Vacuette) para obter as PBMCs através de uma técnica de gradiente de concentração (Ficoll-Paque). As células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e após centrifugação (400 g, 30 min, 20°C), obteve-se um anel de PBMC, recolheu-se e contou-se as células numa câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripano (Sigma-Aldrich, EUA). As células foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi > 98%. As amostras foram coletadas após aprovação de todos os voluntários do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (UFPE, Brasil nº 1.870.360 / 2016).

4.5.2 Cultura de linfócitos e estimulação in vitro com o polissacarídeo

Os linfócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com soro bovino fetal a 10% (p/v) (Sigma-Aldrich, EUA) em placas de 24 poços (TPP Techno

Plastic Products, Suíça) a uma densidade de 106 células/poço. As culturas de sobrenadantes de linfócitos foram utilizadas em ensaios para avaliar a viabilidade celular e produção de citocinas. Todas as culturas foram tratadas com 50, 25, 12,5, 6 e 3 µg/mL do exopolissacarídeo e permaneceram com este estímulo durante 24h em ensaios para análise de viabilidade celular. Outros ensaios foram realizados utilizando 12,5 µg/mL do exopolissacarídeo em 24h de tempo de incubação. Os controles foram realizados utilizando células não tratadas em meio de cultura.

4.5.3 Análise da viabilidade celular

Linfócitos tratados com exopolissacarídeo durante 24 horas de incubação bem como células não tratadas foram centrifugados a 450g à 4°C durante 10min. Após descartar o sobrenadante, adicionou-se 1mL de PBS1X ao precipitado e após ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (450g, 4°C, 10min). O sedimento foi ressuspenso em 300 µL de tampão de ligação (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM), transferido para um tubo citométrico marcado e anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1: 500) e iodeto de propídio (PI, 20 µg/mL). A citometria de fluxo foi realizada em uma plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, EUA) e os resultados foram analisados utilizando o software CellQuest Pro (BD Biosciences). A análise da anexin-FITC negativo/PI positivo células foram consideradas como necróticas e Annexin-FITC positivo/PI negativo células foram consideradas no estágio inicial de apoptose. Os negativos duplos foram considerados células viáveis.

4.5.4 Medição da produção de citocinas

Os sobrenadantes de culturas tratadas com o exopolissacarídeo (politol) durante 24 h, assim como células não tratadas, foram recolhidos para quantificar as citocinas e os ensaios de óxido nítrico. A avaliação de citocinas foi realizada utilizando a citoquina Th1/Th2 humana II (Becton Dickinson Biosciences, EUA) para detecção simultânea das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interferon-gama (IFN-γ). A medição de citocinas foi baseada no princípio da tecnologia Cytometric bead array (CBA) e

todos os dados foram adquiridos na plataforma FACSCalibur. O CBA utiliza micropartículas ou esferas marcadas com intensidade de fluorescência discreta. As pérolas de captura foram marcadas com alo ficocianina e foram lidas a 650nm. O anticorpo de detecção específico para citocinas foi marcado com fluorocromo de ficoeritrina que emite a 585nm em parâmetros amarelos. A intensidade de fluorescência do parâmetro amarelo é proporcional à quantidade de citocina presente nas amostras de teste. Resumidamente, amostras de teste (50µL) e anticorpo de detecção de ficoeritrina foram incubadas com reagente de pérola de captura durante 3h no escuro à temperatura ambiente. Todos os anticorpos não ligados foram lavados (1,0mL de tampão de lavagem kit) e ressuspensos em 300µL de tampão de fixação kit antes da aquisição dos dados na plataforma FACSCalibur. Cada citocina tinha um pico único e bem separado e seis curvas padrão de citocina individuais (0-5000 pg / mL) foram executadas em cada ensaio. O intervalo de detecção estava entre 3000 pg / mL e 5000 pg / mL de acordo com as instruções do fabricante.

4.5.5 Análise estatística

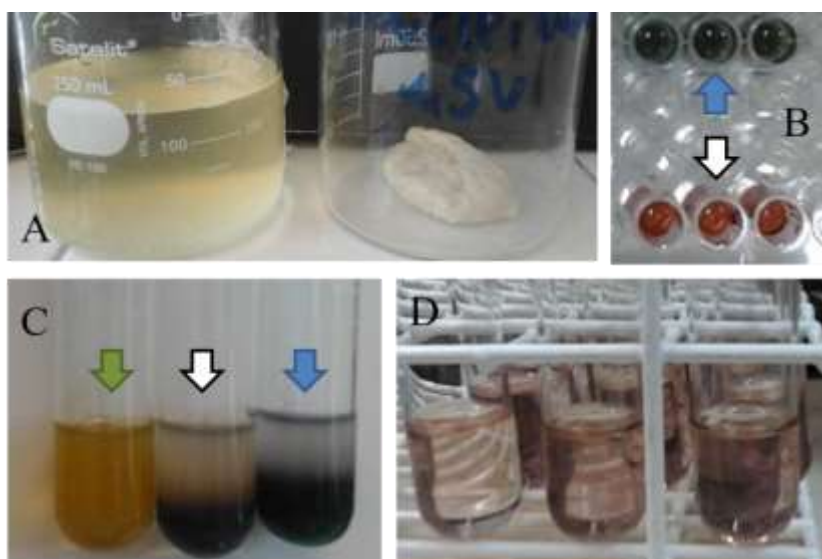
Os dados foram analisados por meio de testes não-paramétricos. Antes da análise, os dados das amostras foram avaliados utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov para indicar se as amostras apresentaram distribuição gaussiana. Para a detecção das diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Todos os resultados foram expressos como média \pm DP e um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POR ENSAIOS PRELIMINARES

A partir de 20g de extrato seco da alga foi obtido um rendimento de massa do produto final de 1,58% (**Figura 18A**). O teste de Molish realizado com o material após a extração indicou a presença de carboidratos (**Figura 18C**), demonstrando assim, que o método de extração foi capaz de extrair o polissacarídeo. A análise espectroscópica na região do UV-VIS mostrou ausência de proteínas (ensaio de Bradford) (**Figura 18B**) ou grupos aromáticos na amostra, por não apresentar absorções características desses grupos, Wang e colaboradores também utilizaram estes tipos de ensaios para verificar a presença de impurezas presentes na extração de polissacarídeos (WANG et al., 2015). O teste de fenol sulfúrico (**Figura 18D**) é representado na figura abaixo. O teste de fenol-sulfúrico não detectou quantidade suficiente de polissacarídeos, acredita-se que o motivo seja por intermédio das substituições de grupos OH por grupos SO_3 que são muito significativos na amostra, como vai ser enfatizado na técnica de RMN e FT-IR.

Figura 18-Painel de extração e caracterização do polímero; A) Extração do polímero; B) Ensaio de Bradford amostra (seta branca), albumina (seta azul); C) Ensaio de Molish amostra (seta branca), glicose (seta azul), somente reagentes (seta verde); D) ensaio fenol- ácido sulfúrico.

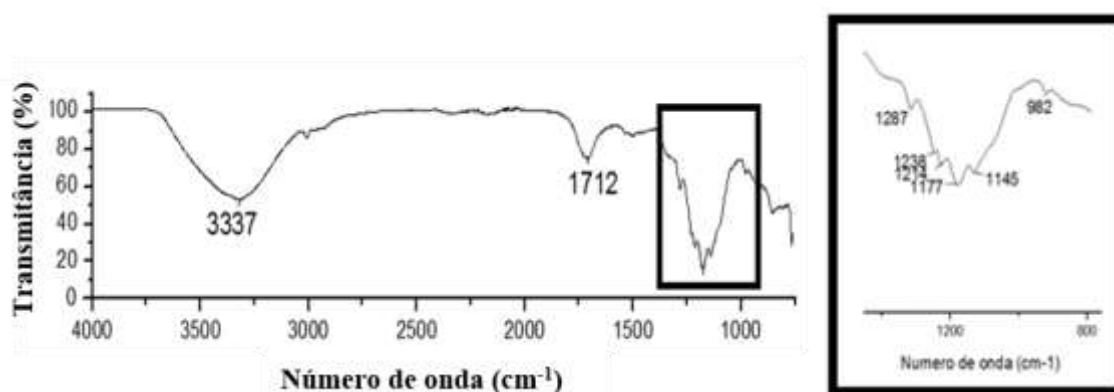


Fonte: Arquivo pessoal (2017).

5.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A partir da extração do precipitado solúvel coletado da macroalga vermelha, são apresentados abaixo os seguintes espectros para a região compreendida entre 750 e 4000 cm^{-1} (Figura 19).

Figura 19-Espectro da região do infravermelho ($4000\text{-}750\text{cm}^{-1}$) das frações polissacarídicas sulfatadas da *B. occidentalis*



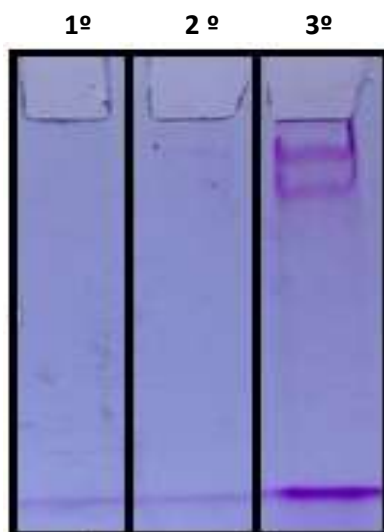
Fonte: Arquivo Pessoal (2017).

Absorções compreendidas entre a região de 3000 cm^{-1} são características de grupos funcionais OH. Os picos de 1700 cm^{-1} refere-se a ligação C=O. Ampliando a região compreendida entre $800\text{ e }1500\text{ cm}^{-1}$ destaca-se grupos funcionais da região entre $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ referentes à ligação C-O. Absorções características específicas de polissacarídeos sulfatados como já foram demonstradas nas absorbâncias entre $1660\text{ e }1220\text{ cm}^{-1}$. A partir da análise de infravermelho é possível deduzir que o método de extração abordado foi capaz de isolar o polissacarídeo em análise.

5.3 ELETROFORESE DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA

O azul de toluidina possui a capacidade de integração com compostos sulfatados e essa reação apresenta uma coloração violeta que foi observada no precipitado isolado. O mesmo apresentou 2 bandas definidas (Figura 20). Observou-se que o tipo de extração realizada do polissacarídeo apresentou sulfato, sendo comparado com o controle negativo que foi o amido, pois não apresenta sulfato em sua estrutura polissacarídica.

Figura 20-Eletroforese em gel de poliacrilamida 30% da extração de polissacarídeos da alga marinha vermelha *B. occidentalis*. 1º canaleta: Amido, 2º canaleta: Agarose; 3º canaleta: Polissacarídeo isolado. 10 µL da amostra juntamente com os padrões foram aplicados ao gel a pH 9 e submetidos a eletroforese a 110 V/cm por 1 hora. Após o gel foi corado em solução de azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%. A descoloração do gel foi realizada com ácido acético 1%



Fonte: Arquivo Pessoal (2017).

5.4 ANÁLISE ELEMENTAR

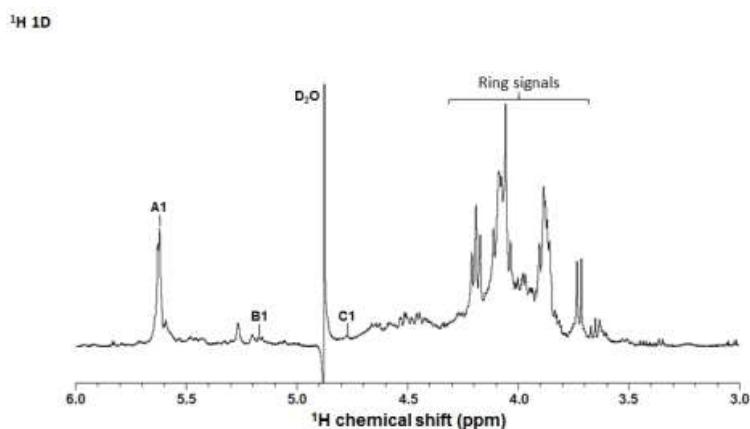
Com o objetivo de analisar a composição química do polissacarídeo extraído foram realizadas medidas de análise elementar. Por meio dessa técnica foram apresentadas as seguintes porcentagens dos macro-elementos: Carbono (21,44%), Hidrogênio (3,88%), Enxofre (8,33%), Nitrogênio (0,72%) e Oxigênio (65,63%) comprovando que a amostra apresenta porção sulfatada. A presença de carbono, hidrogênio e oxigênio indicam a presença de um carboidrato, a detecção do enxofre e oxigênio corrobora com os dados obtidos de FTIR que sugerem a presença de grupos sulfatos na amostra.

5.5 ESPECTROSCOPIA DE RESSONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Os espectros foram registrados a 37 ° C para amostras em solução de D₂O. Os deslocamentos químicos são relativos ao ácido trimetilsililpropiónico externo a 0ppm. A água residual foi suprimida por pré-saturação. O espectro de ¹H-RMN (**Figura 21**) 1D apresenta sinais anoméricos atribuídos A (5,62 ppm) e B (5.17 ppm) que se referem

àqueles produzidos por unidades α (1 \rightarrow 3), enquanto que os produzidos por resíduo β (1 \rightarrow 4) foram rotulados como C (4,73 ppm).

Figura 21-Espectro de ^1H RMN a 500 MHz do polissacarídeo de *B. occidentalis*



Fonte: Arquivo Pessoal (2017).

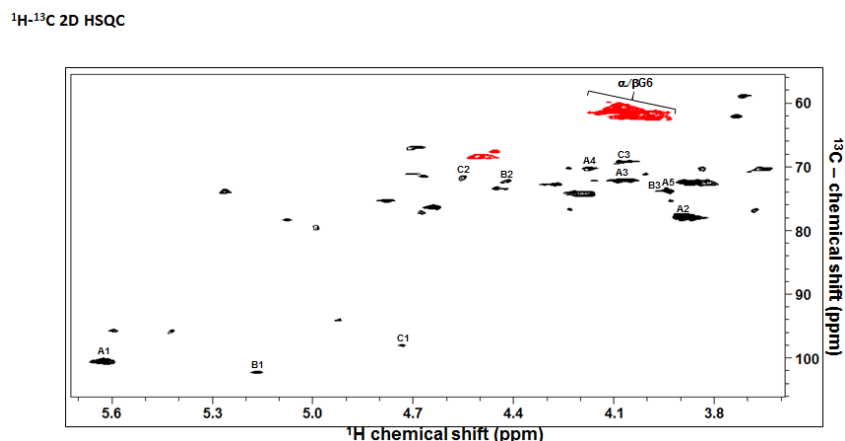
A **Tabela 1** em seguida obtém mais informações sobre mudanças de ^1H -química dos resíduos A, B e C do polissacarídeo com perfil de galactanas. E estão de acordo com o espectro $2\text{D}^{13}\text{C}$ - ^1H HSQC editado (**Figura 22**).

TABELA1. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ resíduos de α - e β -galactopiranosídeos em galactana nativa extraído de *B. occidentalis*

Sinais ^a	4- α -D-Gal-non(SO ₃ ⁻)-1 (resíduo A)	4- α -D-Gal-2(SO ₃ ⁻)-1 (resíduo B)	3- β -D-Gal-2(SO ₃ ⁻)-1 (resíduo C)
H1/C1	5.62/100.5	5.17/102.2	4.73/97.9
H2/C2	3.89/77.9	4.42/72.1	4.55/71.5
H3/C3	4.07/72.1	3.95/73.7	4.06/69.2
H4/C4	4.17/70.1	-	-
H5/C5	3.93/73.7	-	-
H6/C6	3.65/70.1	-	-

^aOs deslocamentos químicos eferenciados ao ácido triemtilsilil propiónico interno a 0 ppm. Os valores em negrito indicam posições com éster de sulfato. Fonte: Arquivo pessoal (2017).

Figura 22- 2D $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ editado HSQC do Polissacarídeo

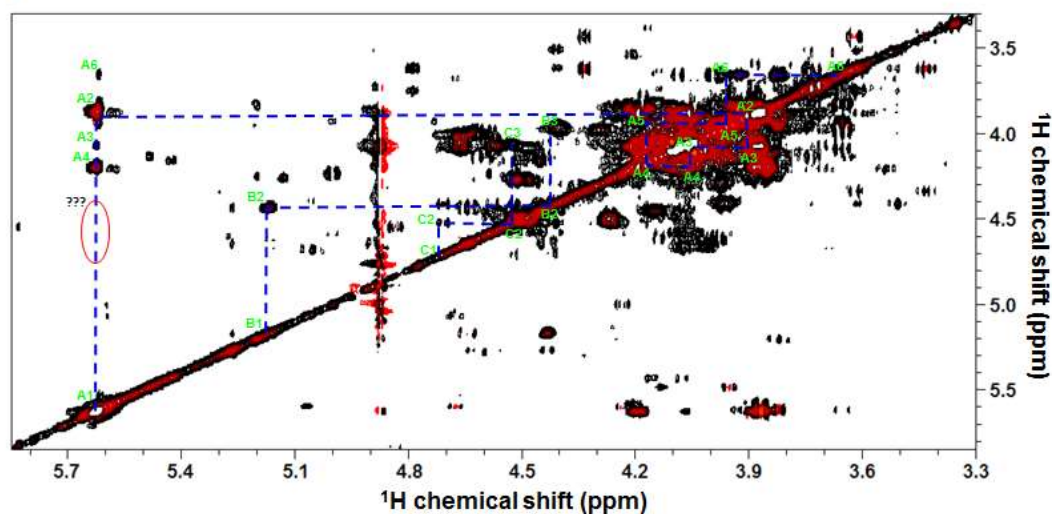


Fonte: Arquivo Pessoal (2017).

Diante dos resultados apresentados existe uma complexidade da amostra extraída e isso impede uma caracterização estrutural acurada. É necessária a realização de uma desulfatação completa da amostra para analisar o esqueleto de carbono total de ambos os resíduos da α - e β -galactopirranose. Os sinais destacados em negrito correspondem a alguns pontos de sulfatação localizados (**Tabela 1**). Os sinais destacados em vermelho era para estarem com deslocamento de próton em campo mais baixo dos quais foram detectados para confirmar a 2,3-disulfatação desse resíduo, porém isso não foi detectado o que indica uma possível dessulfatação desse resíduo durante o processo de purificação. O uso de alguns solventes orgânicos e aquecimento à 100 °C podem causar a dessulfatação de polissacarídeo sulfatados.

Os sinais correspondentes ao H2 (~4,64ppm) e H3 (~4.43ppm) correspondem aos ^1H ligados aos carbonos 2SO_3^- e 3SO_3^- , respectivamente não aparecem no espectro para o resíduo A, os mesmos apareceram com deslocamentos em 3.89 e 4.07 ppm respectivamente (**Figura 23**). Provavelmente ocorreu a dessulfatação desse resíduo de galactose em ambas posições.

Figura 23- $^1\text{H}/^1\text{H}$ 2D TOCSY: Espectros de galactano nativo das algas vermelhas *B. occidentalis* a 500 MHz, 37 ° C, em D_2O .

^1H - ^1H 2D TOCSY

Obs.: Os sistemas de rotações para unidades-a-unidade e b são mostrados como linhas tracejadas. O galactana nativo mostra um espectro muito complexo, mas mostra picos cruzados inequívocos de resíduo B e C de H1 a H2 e H3. A alta intensidade do resíduo A permitiu uma sinalização completa.

Fonte: Arquivo Pessoal (2017).

Os sinais correspondentes ao H2 (~4,64ppm) e H3 (~4.43ppm) que correspondem aos ^1H ligados aos carbonos 2SO_3^- e 3SO_3^- , respectivamente não aparecem no espectro para o resíduo A, os mesmos apareceram com deslocamentos em 3.89 e 4.07 ppm respectivamente, provavelmente ocorreu a dessulfatação desse resíduo de galactose em ambas posições.

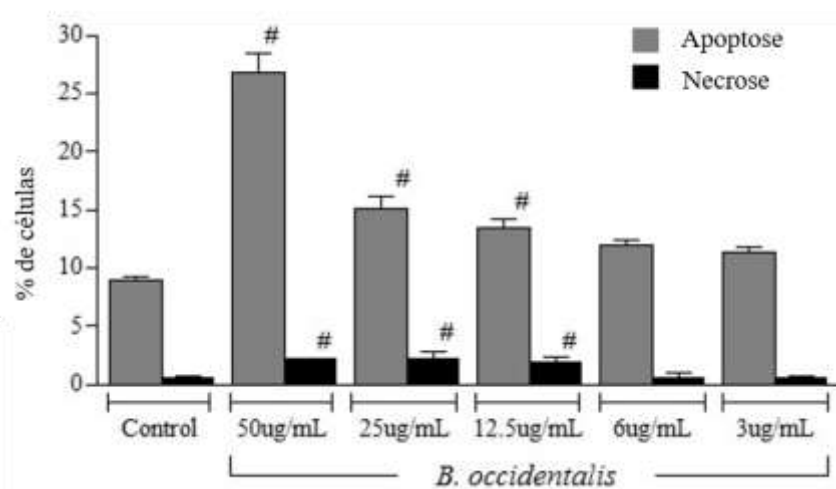
5.6 AVALIAÇÃO CITOTÓXICA FRENTE A CÉLULAS CANCERÍGENAS

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade realizados nas linhagens neoplásicas HEP-2, MCF-7 e K-562, indicaram que o polissacarídeo extraído da *Botryocladia occidentalis* apresentou baixo potencial citotóxico para Leucemia mielocítica crônica (K-562) de 38%, para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) foi 22% e para o carcinoma de laringe humana (HEP-2) de 27%. Alguns carboidratos induzem uma quantidade enorme de atividades biológicas, como anticoagulante, co-fator para crescimento, ativação de quimiocinas, sinalização celular, entre outras (DELATTRE et al., 2005).

5.7 CITOTOXICIDADE DO POLISSACARÍDEO EM CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS

Quando testado frente à linhagem de células mononucleares humanas extraídas do sangue periférico (PBMC), o polissacarídeo apresentou citotoxicidade de forma dose-dependente, sendo indutor de apoptose e necrose significativas em 50 µg/mL (**Figura 24**).

Figura 24- Efeitos da viabilidade celular de linfócitos humanos tratados com opolissacarídeo em diferentes concentrações.



Obs.: A dose de segurança a utilizar é inferior a 12,5 µg/ml. Os valores apoptóticos e necróticos encontrados nas células tratadas foram semelhantes às células do controle (células + meio) em 6 e 3 ug/ml. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicata. # P = 0,03.

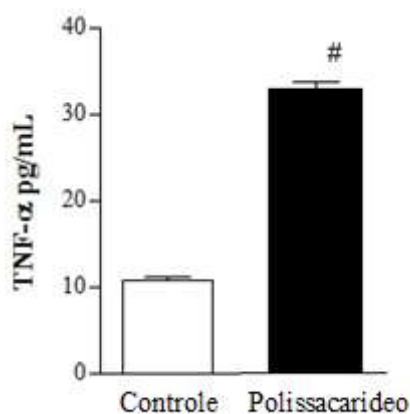
Fonte: Arquivo Pessoal (2017).

Foi demonstrado que polissacarídeos extraídos de alga, como a fucoidana, inibem a expressão e secreção do fator de crescimento endotelial vascular, e alguns polissacarídeos são capazes de suprimir a neovascularização de células de sarcoma em implantes de ratos (SENTHILKUMAR et al., 2013).

A literatura de compostos bioativos extraídos e verificados como citotóxicos sobre células cancerígenas é ampla em relação a algas vermelhas; a alga rodófito *Gracilaria lemaneiformis* inibiu a proliferação de células tumorais de fígado do tipo H22 e exibiu notáveis atividades imunomoduladoras, o composto bioativo pertence à classe das galactoses, um polissacarídeo ácido (ZHONG; CAO; WANG, 2012).

Outros trabalhos relataram que as células T estimuladas com o polissacarídeo λ -carragenana aumentaram a produção de citocinas (TSUJI et al., 2003). Após o ensaio citotóxico frente às células normais, uma concentração baixa do polissacarídeo sulfatado não induziu nenhum tipo de morte celular em células de PBMC que foram utilizadas para investigação do possível perfil imunomodulador do composto. Os resultados demonstraram que o polissacarídeo em análise foi capaz de induzir a produção apenas de TNF- α (Figura 25).

Figura 25- Perfil da produção de TNF- α promovido pelo polissacarídeo em culturas de linfócitos humanos durante 24 horas de ensaio



Obs.: O polissacarídeo foi capaz de produzir maior TNF- α em relação às células de controle. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicado. # P = 0,03.

Fonte: Arquivo Pessoal (2017).

O TNF- α pode ser produzido por diversas células, sugere-se: linfócitos, macrófagos e monócitos e podem induzir a apoptose celular. Estes resultados demonstraram que o polissacarídeo extraído se torna citotóxico para a concentração de 10pg.ml, contudo já fora demonstrado que o TNF- α quando liberado em baixas concentrações pode agir nas células endoteliais, estimular a produção de outras citocinas e apresentar ação quimiotática e de sinalização tumoral (VITALE; RIBEIRO, 2007; WAJANT et al., 2003).

Os polissacarídeos sulfatados podem oferecer proteção contra a degradação proteolítica, assim como, prolongar o tempo de meia vida das citocinas e aumentar a atividade biológica dentro dos tecidos (CLARKE et al., 1995). Alguns anti-inflamatórios não-esteroides inibem parcialmente a hiperalgesia na inflamação quando induzidas por carragenina, e a

casca de citocinas precede após esta indução (NAKAMURA; FERREIRA, 1987). A hiperalgesia induz a formação do hormônio peptídico, a bradicinina estimulando a liberação de TNF- α e conseqüentemente outras citocinas (CUNHA et al., 1982).

Estudo com a alga vermelha *Gracillaria crinale* revela que a galactana sulfatada extraída apresenta mecanismos que não envolvem a bradicinina, sugerindo que neste trabalho o TNF- α pode ser induzido segundo a inibição da enzima COX-2 ou através da liberação/ação de eicosanóides em atividades anti-inflamatórias, como afirmou Souza (2010). Algumas citocinas como IL-2, IL-7 e INF- λ mostraram que podem interagir com polissacarídeos sulfatados da alga verde *Codium fragile* (NIKA et al., 2003). Isso denota que as algas produzem polissacarídeos sulfatados que induzem respostas imunológicas diferentes já que o polissacarídeo desta dissertação induziu apenas a formação de TNF- α na espécie *Botryocladia occidentalis*. Outros polissacarídeos sulfatados como a λ - carragenana podem reduzir as ações alérgicas, devido à redução na IgE(JIAO et al., 2011)

Diante do observado e segundo Choi et al. (2005) sugere-se que existem evidências de polissacarídeos sulfatados que aumentam a citotoxicidade celular e a resposta celular contra tumores.

6 CONCLUSÃO

Com a metodologia de extração utilizada foi possível isolar um polissacarídeo da alga vermelha *Botryocladia occidentalis*. E os testes químicos (molisch, fenol-sulfúrico, Bradford) indicaram que a fração polissacarídica isolada da alga está isenta de contaminações. Na espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) foi possível observar máximos característicos de polissacarídeos, enquanto que, na eletroforese foi possível detectar a presença de grupos sulfatados a partir da reação de metacromasia, adicionalmente, a presença de sulfato foi confirmada também a partir da análise elementar. Estruturalmente, o polissacarídeo isolado apresentou características de uma galactana sulfatada. O espectro do RMN permitiu identificar ligações do tipo α (1 \rightarrow 3) e β (1 \rightarrow 4). Segundo os resultados obtidos do 2D¹³C-¹H HSQC e ¹H/¹H 2D TOCSY é necessária uma dessulfatação completa da amostra. O teste de citotoxicidade apresentou um potencial farmacológico baixo para as linhagens cancerígenas testadas, cujo melhor resultado foi para a leucemia mielóide crônica (K-562), é importante considerar que a fração ainda pode ser testada para outros tipos de cânceres, e uma possível purificação mais eficiente no futuro possa intensificar a ação cancerígena do polissacarídeo.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 5^a ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2005. 580 p.

AFONSO-CARRILLO, J.; SOBRINO, C. Vegetative and reproductive morphology of *Botryocladia botryoides*, *B. occidentalis* and *B. canariensis* sp. nov. (Rhodymeniaceae, Rhodophyta) from the Canary Islands. **Phycologia**, v. 42, n. 2, p. 38-150, 2003.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**, 4^a edição, Porto Alegre, Artmed, 2004.

ALGABASE (Biblioteca virtual). Disponível em; <<http://www.algaebase.org/>> Acesso em: 06 July. 2017.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES A. C. R. **Cultivo celular**. v. 2, cap. 5, p. 4, 2010.

AMORIM, A. L. **Genética do câncer**. Brasília: Uniceub, 2002. 42 p.

ANDERSON, N. S., DOLAN, T. C., REES, D. A. Carrageenans. VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. The covalent structure of iotacarrageenan. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, v. 1, n. 19, p. 2173-2176, 1973.

AROSA, F.; CARDOSO, E.; PACHECO, F. **Fundamentos de Imunologia**. Lisboa: Lidel. 2012.

BARROS, A. C. S. D, BARBOSA, E. M, GEBRIM, L. H. **Diagnóstico e tratamento do câncer de mama**. [on-line]. In: Projeto Diretrizes. Brasília (DF): Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina; 2001; Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/024.pdf. Acesso em: 09 jul. 2017.

BARROSO, F. E. C. et al. Effect of sulfated polysaccharides extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis* in shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*). **Rev. Ciên. Agron.**, v. 38, n. 1, p. 58-63, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v.72, p. 248-254, 7 may 1976.

BERNE, R. M. et al. **Fisiologia**, 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000.

BOHN, J.A.; BEMILLER, J. N. (1-3)- β -D- Glucans as biological response modified review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate polymers**. v. 28, p. 3-14, 1995.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the lymphocyte functions. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 57, p. 487-502, 1998.

CAMPO, V. L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis– A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n.2, p. 167-180, 2009.

CARVALHO, G. B. **Fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermoide de laringe estágio clínico T4 tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas**. 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em ciências)- Programa de Oncologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CHOI, E. M. et al. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro*. **J. Med. Food**. v. 8, p.446–453, 2005.

CHOPIN, T.; WAGEY, B. T. Factorial study of the effects of phosphorus and nitrogen enrichments on nutrient and carrageenan content in *Chondrus crispus (Rhodophyceae)* and on residual nutrient concentration in seawater. **Bot. mar.**vol. 42, p. 23-31, 1999.

CIANCIA, M., MATULEWICZ, M.C., CERESO, A.S.L-galactose – containing carrageenan from the carrageenophyte *Gigartina skottsbergii*. **Phytochem.**, v. 34, p. 1541-1543, 1993.

CLARKE, D. et al. Interaction of interleukin-7 with glycosaminoglycans and its biological relevance. **Cytokine**, v. 7, p. 325-330, 1995.

COCCO, M. T. et al. Synthesis and in vitro antitumoral activity of new hydrazine pyrimidine-5-carbonitrile derivatives, **Bioorg.Med. Chem.**v. 14, p. 366- 372, 2006.

CORDEIRO, T. M. **Galactanas sulfatadas: estrutura química e atividade biológica**.2014. 144 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

COSTA, L.S. **Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga vermelha *Gracilaria caudata***. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

COSTA, M. S. S. P. et al. Antioxidant sulfated polysaccharides from seaweeds. In: Vitor Hugo Pomin. (Org). **Seaweeds. Agricultural uses, biological and antioxidante agentes**. 1º edição. New York: Nova Publishers, v.1, p.189-208. 2014.

CRITCHLEY, A. T.; OHNO, M. Seaweed research of the world. **Japan International Cooperation Agency**.p.366-371, 1997.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin- 8 as a mediator of sympathetic pain. **Br.J. Pharmacol.** v. 104, p. 765–767, 1982.

DABA, A. S.; EZERONYE, O. U. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 672-678, 2003.

DAVIS, T.A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A. Review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, p. 4311-4330, 2003.

DAY, J.G.; BENGSON, E.E.; FLECK, R.A. *In vitro* culture and conservation of microalga: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In vitro cell dev. Biol. Plant**, v.35, p. 127-136, mar. 1999.

DAMONTE, E. et al. Herpes simplex Vírus-Inhibitory Sulfated Xylogalactans from the Red Seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Experimental Chemotherapy**, v. 42, p. 57-64, 1996.

DEDIVITIS, R. A. et al. Estudo do linfonodo cervical pela citologia do imprint. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**. vol. 40, p. 26-29, 2011.

DELATTRE, C. et al. Oligosaccharides engineering from plants and algae applications in biotechnology and therapeutics. **Minerva Biotec**. v. 17, p. 107-117, 2005.

DELATTRE, C; FENORADOSOA, T.A; MICHAUD P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 54, n. 6, p. 1075-1092, 11 dec. 2011.

DELLAVANCE, A.; ANDRADE, L. E. C. Das células LE às células HEP-2: perspectiva histórica e avaliação crítica do teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinúcleo. **Rev Bras Med**. 69 (1/2), p. 07-21. Jan\fev 2012.

DIETRICH, C. P. et al. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant science**, v. 108, p. 143-153, 1995.

DININNO, V.; MCCANDLESS, E.; BELL, R. Pyruvic acid derivative of carrageenan from a marine red algae (*Petrocelis* species). **Carbohyd.Res.**, 71, C1-C4, 1979.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem**. v. 28: 350-356, 1956.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol.Pathol**. v.35, p. 495–516, 2007.

ENGELBERG, H. Heparin, non-heparin glycosaminoglycans and heparinoids: an overview of their application in arteriosclerosis. **Semin.Thromb.Haemost.**, v. 17, p. 5-8, 1991.

EVORA, M. C. et al. Comparação de Técnicas FTIR de Transmissão, Reflexão e Fotoacústica na Análise de Poliamida-6, Reciclada e Irradiada. **Polímeros**, v.12, n. 1, p. 60-68, 2002.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R. H. Carrageenans from the tetrasporic stages of *Gigartina clavifera* and *Gigartina alveata* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohyd. Res.**, v. 276, p. 155-165, 1995.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R.H. Structural analysis of carrageenans from the tetrasporic stages of the red algae, *Gigartina lanceata* and *Gigartina chapmanii* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohyd. Res.**, v. 307, p. 325-331, 1998.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R. H., STEVENSON, D. E. Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 1149-1158, 2005.

FARIAS, W. R. L. et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

GABRIEL S. A. et al. Perda súbita da audição e infiltração neoplásica de sistema nervoso central como complicações da leucemia mieloide crônica. **Rev Fac Ciênc Med.** 9 (2):15-8, 2007.

GADELHA, M. M. S. et al. Effects of free and liposome-encapsulated heteropolysaccharide from *Anacardium occidentale* L. against experimental *S. mansoni* infection. **In: Pharmatech**, v. 6, Recife: Sociedade brasileira de tecnologia farmacêutica, 2001. p. 65-66.

GOMES, D. M. **Efeitos de galactanas sulfatadas das algas marinhas *Botryocladia occidentalis*, *Champia feldmannii* e *Solieria filiformes* no processo inflamatório agudo e na nocicepção.** 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

GREER, C.W., YAPHE, W. Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Euclima gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using Carrageenases, infrared and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Bot. Mar.**, v. 27, p. 473-478, 1984.

HAYAKAWA, M. et al. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. **Antonie Van Leeuwenhoek** 78, p. 171-185, 2000.

HARVEY, W. H. **Algae In: Flora Hybernica, part 3**, Dublin: Mackay, J. T. Editors, P. 157-254, 1836.

INCA: **INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER: ESTIMATIVA 2001.** Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/relatorios/rel_2001/relatorio_completo.pdf. Acesso em: 09/08/17.

INCA: **INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER: ESTIMATIVA 2003.** Disponível em: http://www.inca.gov.br/releases/press_release_view_arq.asp?ID=34. Acesso em 09/08/17.

INCA: **INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER: ESTIMATIVA 2016.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>. Acesso em 09/08/2016.

JIAO, G. et al. Chemical structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Mar. Drugs**, v. 9, n.2, p. 196-223, 2011.

KADAM, S. U.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. **J. Agric. Food Chem**, v. 61, n.20, p. 4667-75, 2013.

KASSAKUL, W. et al. Characterization of the mucilages extracted from *Hibiscus rosa-sinensis* Linn and *Hibiscus mutabilis* Linn and their skin moisturizing effect, **Int. J. Pharm. Pharm Sci.** v. 6, p. 453-457, 2014.

KOWALSKI, J. R, DAHLBERG, C. L, JUO, P. The deubiquitinating enzyme USP-46 negatively regulates the degradation of glutamate receptors to control their abundance in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. **J. Neurosci.**v. 31, p. 1341–1354, 2011.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides oceanography and marine biology. **Oceanography and marine biology: An annual review**, ed. 26, pp. 259-315. 1988.

KRAAN, S. Carbohydrates –Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. In: Chang C-F (ed). *Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook*. **INTECH Open Access Publisher**: Vienna, Austria, pp 459–532, 2012.

KROEMER, G.; POUYSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. **Cancer Cell.**v. 13, p. 472–482, 2008.

LAUDARES, S. S. A. et al. Produção de exopolissacarídeo por bactérias do ácido láctico. **Reunião Regional da SBPC em Lavras, MG**, Universidade Federal de Lavras, 2010.

LEAL, A. P. F. **Aplicação do método de ressonância magnética nuclear para identificação e quantificação de polissacarídeos meningocócicos sorogrupos C e W135**. 2013. 144 f. Dissertação (Mestrado profissional em tecnologia de imunobiológicos). FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 7ed. São Paulo: Sarvier, p.725, 1991.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEVIN, M. J. Impact of herpes virus infections in the future. **Leme JG, Wilhelm DL** 1: 58-164, 1993.

LEY, K.; CERRITO, M.; ARFORS, K.E. Sulfated polysaccharides inhibit leukocyte rolling in venules by protamin and sulfated polysaccharides. **American Journal of Physiology**, v. 260, p. 667-673, 1991.

LI, Y. et al. Chemical components and its antioxidant properties “*in vitro*”: an edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 5, p. 1963-1973, 2009.

LINHARDT, R. J.; TOIDA, T. Heparin oligosaccharides: new analogues development and applications. In Z. J. Witezak & K. A. Nieforth, **Carbohydrate in drug design**, New York: MareI Dekker, cap. 7, p. 277- 341, 1997.

LOZIO, C. B.; LOZIO, B. B. **Blood**, v. 45, p. 321-334, 975.

LUZYANIN, K; ABRANTES, M. Ressonância magnética nuclear – Ferramenta versátil em química farmacêutica e imagiologia médica. **Revista da sociedade portuguesa de química**. Lisboa. v. 117, p. 25-30, 2010.

MANNARINI, L. **Fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermoide de laringe estágio clínico T3 tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas**.2013. 201 f. Tese (Doutorado em ciências)- Programa de oncologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MANDAL, P. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*.**Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2193-2199, 2008.

MANN, J. Natural products in câncer chemotherapy: past, presente and future. **Nature Reviews cancer**, v. 2, p. 143-148, 1 feb. 2002.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **A natureza e os polímeros. Meio ambiente, geopolímeros, fitopolímeros e zoopolímeros**. Ed. São Paulo: Blucher, p. 403-412, 2001.

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. Microbial polysaccharides. In: Moo-Young. **Comprehensive Biotechnology**.Oxford: Pergamon Press, v. 3, p. 1005-1041, 1985.

MASSARO, D. L. **Perspectivas para a avaliação qualitativa e quantitativa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos do manguezal do Itacorubi através da técnica de ressonância magnética nuclear de próton**. Estágio supervisionado (Relatório de estágio)- DPTO de química- Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, Florianópolis, 2005.

MASSUMOTO, C.; HAMERSCHLAK, N. **Leucemia Mieloide Crônica**. Manuais da ABRALE (Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia). São Paulo –SP, 2012.

MCCANDLESS, E.L., WEST, J.A., GUIRY, M.D. Carrageenan patterns in the Gigartinaceae. **Biochem.Syst. Ecol.**, v. 11, p. 175-182, 1983.

McCAFFREY, T. A. et al. Fucoidan is a non-anticoagulant inhibitor of intimal hyperplasia. **Biochem.and Biophysical Res. Communications**. v. 184, p. 773-781, 1992.

MCHUGH, D. J. **A guide to the seaweed industry**.In papers, F. F. T., Ed AFO: Rome, v. 441, p. 118, 2003.

MELO, F. A. D. **Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeo extracelular por *Zoogloea sp* em melão de cana-de-açúcar**2003. Tese (Doutorado em tecnologia e geociências - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

MILLER, I. The chemical structure of galactans from some New Zealand red algae. **Bot., Mar.**, v. 46, p. 572-577, 2003.

MOURÃO, P.A. S.; ASSREUY, A.M.S. Trehalose as a possible precursor of the sulfated L-galactan in the ascidian tunic. **J. of Biol. Chem.** v. 270 (7), p. 3132-3140, 1995.

MOURÃO, P.A.S; PEREIRA, M.S. Searching from alternatives to heparin sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends Cardiovasc. Med.** 9 (8): 225-232, 1999.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, 1983.p. 55-63.

NALWOGA, H. et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer. **Br J Cancer** 102: 369–375, 2010.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H.A. Peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.** , v. 135, p. 145–153, 1987.

NECAS, J.;BARTOSIKOVA, L.Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, p. 235-270.

NGUYEN, Y.; NOUSSAIR, C. N. Risk aversion and emotions. **Pacific economic review**. 19(3): 296-312, 2014.

NIKA, K. et al. Specific recognition of immune cytokines by sulphated polysaccharides from marine algae. **Eur. J. Phycol.** v. 38., p. 257-264, 2003.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. A. Exploração de algas marinhas no Brasil: situação atual e perspectivas futuras. **Phycol. Lat. Amer**, v. 1, p. 5-18, 1981.

PALMERO, E. I. **Hereditariedade e Câncer de mama**. Onco & setembro/outubro 2013.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In Aspinall GO (Ed.) **The polysaccharides**. vol. 2, New York: Academic Press, p. 195-285, 1983.

PANGESTUTI, R.; KIM, S.K. Neuroprotective effects of marine algae. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 803–818, 2011.

PATANKAR, M. S. et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **Journal of biological chemistry**, 268: 21770-21776, 1993.

PENMAN, A.; REES, D. A. Carrageenans. IX. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Euचेuma isiforme*, *Euचेuma uncinatum*, *Aghardhiella tenera*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of xi-carrageenan. **J. Chem. Soc.**, 19, 2182-2187, 1973.

PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R.H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Academic Press**, New York & London, 1967.

PEREIRA, L. **Estudos em macroalgas carragenófitas (Gigartinales, Rhodophyceae) da costa portuguesa—aspectos ecológicos, bioquímicos e citológicos.** Programa de Pós Graduação: Tese (Biologia Celular). Faculdade de Ciências e Tecnologia de Coimbra, 2004.

PEREIRA, M. G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v. 340, P. 2015-2023, 2005.

PÉREZ-RECALDE, M. et al. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from red seaweed *Nemalion helminthoides*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 38-42, 2014.

PRAJAPATI, V. D. et al. Carrageenan a natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 97-112, 2014.

RAGAN, M. A. et al. A molecular phylogeny of the marine red algae (*Rhodophyta*) based on the nuclear small subunit r(RNA) gene. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 15, p. 7276-80, 1994.

RASMUSSEN, R. S.; MORRISEY, M. T. Marine biotechnology for production of food ingredients. **Adv Food Nutr Res.**, v. 52, p. 237-292, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1996. 728p.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2001. p.344-369.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856 p.

REES, D. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 24, p. 267–332, 1969.

REZENDE, L. F. et al. Effect of physical inactivity on major noncommunicable diseases and life expectancy in Brazil. **J Phys Act Health**. 12 (3), p. 299-306, 2015.

RIBEIRO, ANDREA ALVES. et al. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. **Infectious agents and câncer**. 10.1: 16, 2015.

WILKES, R. J.; MCIVOR, L.; GUIRY, M. D. Vegetative morphology and rbcL phylogeny of some members of the genera *Botryocladia* and *Irvinea* (Rhodymeniaceae, Rhodophyta). **Phycologia**, v. 45, n. 5, p. 481-494, 2006.

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R. L. Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas *Haymenia spp.* : Ferramenta taxonômica para algas. **Rev. Bras. Enga. Pesca**. v. 4, p. 7-20, 2009.

ROSS, G. D. et al. Therapeutic intervention with complement and Beta-glucan in cancer. **Immunopharmacology**, v. 42, p. 61 – 74. 1999.

RUSCHEL, C. F. C. et al. Análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) de blends de biodiesel/diesel. **Química Nova**, v. 37, n.5. p. 810-815, 2014.

SANTOS, M. G. M. et al. A screening for the Antiviral Effect of Extracts from Brazilian Marine Algae against Acyclovir Resistant Herpes Simplex Virus Type 1. **Botanica Marine**. v. 42, p. 227-230, 1999.

SANTOS, G.N. et al. Análise quali-quantitativa das algas arribadas do norte do estado da Bahia, Brasil. **Acta botânica malacitana**, v.38, p.13-24, 2013.

SENNI, K.; et al. Fuciodan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 445, n.1, p. 56-64, 2005.

SENTHILKUMAR, K. et al. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.60, p.366-374, 2013.

SILVA, T. M. et al. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** vol. 38, n. 4, p. 523-533, 2005.

SILVA, T. D. **Atividade antitumoral in vitro e in vivo do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (líquen)**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, M. L. C. Caracterização química de glucans fúngicas e suas aplicações biotecnológica. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006.

SILVA, T. M. **Caracterização de polissacarídeos extraídos de cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.) e sua aplicação para imobilização de Horseradish peroxidase (HRP)**. 78f Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, 2007.

SILVA, J. M. C. **Caracterização parcial e atividades farmacológicas do extrato rico em polissacarídeos sulfatados da angiosperma marinha *Halodule wrightii***. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica/Biologia molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

SIMÕES, C.O.M. et al. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 5 ed. Editora da UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Santa Catarina, 1102 p, 2003.

SOEDA, S. et al. Aminated fucoidan promotes the invasion of 3 LL cells through reconstituted basement membrane: Its possible mechanism of action. **Cancer Lett**, v.85, p.133-138, 1994.

SOMENSI, F. Y. K. **Bioprodução de B-(1-6)-D-glucana e obtenção de derivado de por carboximetilação visando atividade biológica**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2014.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of natural products**, vol.61, n.8, p. 1053-1071, 11 July. 1998.

SOUSA, M. B. α - β -caroteno e α -tocoferol em algas marinhas *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p. 953-958, 2008.

SOUZA, M. L. et al. Aplicação de espectroscopias Raman e infravermelho na identificação e quantificação de plastificantes em filmes comerciais de PVC esticável. **Quím. Nova**. vol. 32, n. 6, São Paulo, 2009.

SOUZA, A. A. S. **Galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux: respostas na inflamação e nocicepção**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em ciências fisiológicas)- Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

STEVAN, F. R. et al. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 33, n.4, p. 477-484, 2001.

STEWART, J. A. et al. Herpesviruses infections in person with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.** v. 21 (1), p. 20-114, 1995.

SYNYTSYA, A. et al. Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. **Carbohydrate polymers**, v.81, n.1, p.41-48. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 339-364, 2004.

THÉRIAULT, J. Assessing intimacy with the best friend and the sexual partner during adolescence: The PAIR-M Inventory. **Journal of Psychology**, 132, 493–506, 1998.

TISSOT, B. et al. Interaction of fucoidan with proteins of the complement classical pathway. **Biochem Biophys Acta**. v. 1651(1-2), p. 5-16, 2003.

TSUJI R. F. et al. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. **Clin.Exp. Allergy**, v. 33, p. 249–258, 2003.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biological Function. **Clin.Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000.

UNANUE, E. R.; BENACERRAF, B. **Bases celulares da imunidade**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae. An introduction to phycology**. Cambridge, UK, **Cambridge University Press**. 1995.

VERA, J. et al. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2514-2525, 2011.

VICENTE, J. **Determinação da incerteza expandida associada à análise de açúcares redutores pelo método de Lane-Eynon.** 2010. 82 f. Dissertação(Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) – Instituto de Tecnologia- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG M.D.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química nova**, vol. 27, n.1, p. 139-145, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000100024>. Acesso em: 1 ago. 2017.

VIANA, G. S. B. et al. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz.and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Braz J Med Biol Res**, vol.37 (7), p.1071-1079, July 2004.

VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. A. Q.O papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Rev. Bras. otorrinolaringol.** v. 73, n.1, 2007.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ.** v. 10, n. 1, p. 45-65, 2003.

WANG, W.; WANG, S. X.; GUAN, H. S.The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: An overview. **Mar. Drugs**,v. 10, p. 2795–2816, 2012.

WANG, L. et al. Angelica sinensis polysaccharide induces erythroid differentiation of human chronic myelogenous leukemia k562 cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.16, p. 3715-3721, 2015.

WEITZ, J. New anticoagulant strategies.Current status and future potential.**Drugs.** v. 48 (4), p. 485-497, 1994.

WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, p. 251-286, 2015.

WILKES, R. J.; MCIVOR, L.; GUIRY, M.D.Vegetative morphology and rbc1 phylogeny of some members of the genera *Botryocladia* and *Irvinea* (*Rhodymeniaceae*, *Rhodophyta*).**Phycologia**, vol. 45, n.5, p. 481-494, 2006.

WITHROUW, M. et al. Activity of sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *AghardhieIa tenera* 84 against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chem. Chemother.** v. 5, p. 297-303, 1994.

ZACHARSKI, L. R; ORNSTEIN, D. L. Heparin and cancer.**Thromb.and Haemostasis.** v. 17, p. 289-297, 1998.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F.Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p.1395-1410, 2012.

APÊNDICEA

**Artigo em preparação para ser submetido à revista International Journal of Biological
Macromolecules**

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MACROALGA *BOTRYOCLADIA OCCIDENTALIS*(BORGESEN) KYLIN
COLETADA NO LITORAL DE PERNAMBUCO.**

Brunna Fernanda Lira Patriota^a, Rafael Jorge Santos Aracati Padilha^a, Paulo Antônio Galindo Soares^b, Paulo Antônio de Souza Mourão^b, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^d, Virgínia Maria Barros de Lorena^c, Maria do Desterro Rodrigues^d, Silene Carneiro do Nascimento^e, Cláudia Sampaio de Andrade Lima^a, Ricardo Yara^f

^a*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biofísica e Radiobiologia – CB, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.*

^b*Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho CEP: 21941-913, Rio de Janeiro Brasil.*

^c*Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM, Fiocruz-PE), Laboratório de Imunoparasitologia, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brasil.*

^d*Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais, Departamento de Antibióticos, Av. Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50740-525, Recife, PE, Brasil*

^e*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos – CB, Av. Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50740-525, Recife, PE, Brasil*

^f*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Biomédica – CTG, Av. Professor Moraes Rego, , s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.*

Resumo

As macroalgas marinhas possuem classes de moléculas bioativas de grande importância industrial e farmacêutica. Dentre estes compostos químicos, destacam-se os polissacarídeos sulfatados como o ágar, carragenanas e galactanas. Diferentes tipos de galactanas, majoritariamente extraídas de algas

rodófitas, e fucoïdanas extraídas de algas feófitas demonstraram atividade citotóxica sobre diferentes tipos de linhagens tumorais. Nas últimas décadas, o câncer é considerado um grave problema de saúde pública, diante disso, o presente artigo tem por objetivo extrair e caracterizar polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kyline verificar se estes apresentam atividade antitumoral frente às linhagens celulares específicas: HEP-2 (carcinoma de laringe humana), adenocarcinoma de câncer humano (MCF-7) e K-562 (Leucemia mielocítica crônica). Inicialmente foi realizada uma técnica proteolítica para extração de polissacarídeos. Para a caracterização da amostra foram feitas análises por FTIR, análise elementar, RMN e atividade citotóxica sobre linhagens de células tumorais. A espectroscopia infra-vermelho por transformada de Fourier e RMN, indicaram a presença de polissacarídeos sulfatados. Ademais, também foi observada atividade citotóxica moderada frente a linhagens celulares testadas com citotoxicidade máxima de 38%, e adicionalmente foi realizado um ensaio com células primárias a partir de um kit contendo citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ) demonstrando que o polissacarídeo promoveu apenas ação em TNF- α .

Palavras-chave:

Botryocladia occidentalis, citotoxicidade, polissacarídeo

1. Introdução

As algas marinhas são organismos eucariontes fotossintetizantes avasculares, não possuem raízes, folhas, nem sementes e podem ser unicelulares ou multicelulares [1]. As macroalgas são classificadas de acordo com sua pigmentação em: *Rhodophyta* (algas vermelhas), *Phaeophyta* (algas pardas) e *Chlorophyta* (algas verdes). Essa coloração é determinada pelos pigmentos acessórios e clorofila, como a fucoxantina nas algas marrons, a ficoeritrina nas vermelhas e clorofila nas algas verdes [2].

As algas vermelhas são organismos pluricelulares abundantes em águas tropicais mornas [3], seus compostos bioativos apresentam alta importância industrial e farmacêutica. Dentre estes compostos, têm-se os polissacarídeos sulfatados, como o ágar, a carragenana e a galactana [4]. Os polissacarídeos destas macroalgas apresentam propriedades biológicas notórias como, anticoagulantes, antitrombóticas, capacidade imunomoduladora, antitumoral e antioxidante, sendo aplicadas em muitos biomateriais (RAPOSO et al., 2015).

Novas substâncias com potencial antitumoral como as galactanas extraídas das algas vermelhas *Bostrychia montagnei* e *Porphyra columbina* foram capazes de promover atividade

anticâncer frente às células tumorais de cólon uterino- HeLa [6]. Outras classes de polissacarídeos sulfatados, as fucoidanas, extraídas de *Undaria pinnatifida*, demonstraram atividade antitumoral sobre linhagens tumorais humanas de câncer de próstata (PC-3), de cólon uterino (HeLa) e de carcinoma hepatocelular de fígado (HepG2) [7]. As neoplasias são um grande problema de saúde pública atualmente, e é provável que nas próximas décadas 80 por cento de mais de 20 milhões de diagnósticos patológicos sejam associados a algum tipo de carcinoma até o ano de 2025 [5],

Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos que promovam o tratamento do câncer e a redução de tumores, o presente artigo tem por objetivo extrair, caracterizar polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kylincoletado no litoral Pernambucano e analisar biologicamente o polissacarídeo frente às linhagens celulares específicas: HEP-2 (carcinoma de laringe humana), adenocarcinoma de câncer humano (MCF-7) e K-562 (Leucemia mielocítica crônica) e linfócitos

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta das macroalgas

As coletas foram realizadas em janeiro de 2013, em maré baixa (0,1-0,2m) na praia de Itamaracá. A macroalga *B. occidentalis* foi identificada por um especialista na área e tombada (nº. 60) na Universidade Federal Rural de Pernambuco. As amostras foram conduzidas ao laboratório, onde foram lavadas e retiradas epífitas, sendo em seguida secadas em estufa com circulação forçada de ar a 45°C. Após esta etapa, o material foi triturado e guardado em recipientes plásticos.

2.2 Extração dos Polissacarídeos sulfatados

Inicialmente, o extrato seco da alga foi lavado 4 vezes seguidas para retirar o máximo possível de lipídeos e pigmentos, depois do material estar completamente seco, foi realizada uma reação de proteólise com a enzima papaína, em que 20 g do extrato seco foram colocados em 2 volumes de solução tampão a base de acetato de sódio 100 mM, EDTA 5 mM e cisteína 5 mM a pH 5 por 6 horas a 60°C. Após esse tempo, a solução foi centrifugada, e ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol gelado, observou-se imediatamente o material começando a se precipitar, logo após a solução foi incubada durante 24 horas a 4°C, após esse tempo, o material precipitado foi seco e triturado para serem realizadas as análises, a metodologia modificada através de dois protocolos (Silva et al, 2005; Barroso, 2007).

Todo o processo de extração foi acompanhado através das análises químicas qualitativas para carboidratos através do método descrito por Molish (Pattabiraman, 1998), dosagem de açúcares totais presentes pelo método de fenol e ácido sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956) e o método de Bradford (1976) para detecção de proteínas contaminantes no exopolissacarídeo.

2.3 Espectroscopia por Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais da fração foi realizada utilizando um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (Agilent Technologies Cary 630FITR), módulo ATR. A amostra (10mg) foi prensada contra o diamante usando um grampo de pressão do aparelho. Os espectros de transmissão foram coletados mediante resolução de 8,4 scans, com uma varredura de 4000 a 750 cm^{-1} sob radiação infravermelha.

2.4 Análise Elementar

A análise da amostra (2mg) foi realizada em Analisador Elementar CHNS-O modelo EA 1110 (Carlo Erba) na Central Analítica da Universidade Federal de Pernambuco.

2.5 NMR Spectroscopy

^1H and ^{13}C spectra were recorded using a Bruker DRX 500 MHz with a triple resonance probe. About 10 mg of sample was dissolved in 0.5 ml of 99.9% D_2O . All spectra were recorded at 37 °C with HOD suppression by presaturation. $^1\text{H}/^1\text{H}$ 2D TOCSY, and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ heteronuclear correlation (HSQC) spectra were recorded using states-time proportion phase incrementation for quadrature detection in the indirect dimension. TOCSY spectra were run with 4,096 x 1,024 points with a spin-lock field of about 10 KHz and a mixing time of 80 ms. HSQC were run with 1,024 x 512 points and globally optimized alternating phase rectangular pulses for decoupling. All ^1H chemical shifts were relative to external trimethylsilylpropionic acid and ^{13}C -metanol, both at 0ppm.

2.6 Avaliação da atividade antitumoral do polissacarídeo

As linhagens neoplásicas MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana), K-562 (leucemia mielocítica crônica) e HEP-2 (carcinoma de laringe humana) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, e mantidas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO_2 , em meios específicos RPMI 1640 (Gibco) e DMEM (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid) (Gibco) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Para o repique utilizou-se tripsina/EDTA (0,25%). As células foram plaqueadas numa densidade de $0,3 \times 10^5$ (linhagem em suspensão) e 1×10^4 (linhagem aderida), por poço em placas de 96 poços. As linhagens neoplásicas

foram tratadas com os compostos na concentração final de 50 µg/mL e, em seguida incubadas por 72 horas. Após este período, 25 µL de MTT que, em células metabolicamente ativas será convertido em azul de formazan, foi adicionado, e as células foram reincubadas por 3h. A absorbância foi lida, após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO em espectrofotômetro de placa a 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPadPrism* 5.0. A atividade citotóxica dos compostos de acordo com a escala do National Cancer Institute (NCI), onde os compostos são considerados sem atividade citotóxica quando a inibição percentual apresenta-se no intervalo de 1 - 20%, com pouca atividade quando essa percentagem situa-se entre 20 e 50%, atividade moderada quando a inibição é de 50 para 70% e de alta atividade, quando o intervalo de inibição fica entre 70 a 100%. [11]

2.7 Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Blood (4 mL) from 6 young healthy volunteers (23 to 38 years old), without recent infectious disease, immunosuppression and/or autoimmune disease were collected in heparin tubes (Vacuette) to obtain the PBMCs through a concentration gradient technique (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Life Sciences, Sweden). Cells were washed twice with sterile PBS and after centrifugation (400 g, 30 min, 20°C), a ring of PBMCs was obtained, collected and cells were counted in a Neubauer chamber. Cell viability was evaluated by the trypan blue (Sigma-Aldrich, USA) exclusion method. Cells were only used when viability was >98%. Samples were collected after all of voluntaries signed the “Term of Free and Informed Consent” and experimental protocols were approved by Federal University of Pernambuco Research Ethics Committee (UFPE, Brazil nº 1.870.360/2016).

2.8 Culture of lymphocytes and in vitro stimulation with *Polysaccharides*

Lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) with 10% (w/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA) in 24-well plates (TPP Techno Plastic Products, Switzerland) at a density of 10⁶ cells/well. Lymphocytes supernatant cultures were used in assays to evaluate cell viability, cytokine production and nitric oxide release. All cultures were treated with 50, 25, 12.5, 6 and 3 µg/mL of polysaccharides and remained with this stimulus for 24h in assays for analysis of cell viability. Other assays were performed using 6 µg/mL of polysaccharide in 24h of incubation time. Controls were performed using untreated cells in culture medium.

2.9 Analysis of cell viability

Lymphocytes treated with polysaccharide for 24 hours of incubation as well as untreated cells and were centrifuged at 450 g and 4°C for 10 min. After discarding the supernatant, 1 mL of PBS

1X was added to the precipitate and after resuspension, the cells were centrifuged again (450 g, 4°C, 10 min). The pellet was resuspended in 300 µL of binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.8 mM CaCl₂), transferred to a labelled cytometer tube, and annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500) and propidium iodide (PI, 20 µg/mL) were added. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur platform (BD Biosciences, San Jose, USA) and the results were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences). Annexin-FITC negative/PI positive cells were considered as necrotic and Annexin-FITC positive/PI negative cells were considered in the early stage of apoptosis. Double negatives were considered viable cells.

2.10 Measurement of cytokine production using Cytometric Bead Array (CBA) Kit

Supernatants of cultures treated with polysaccharide for 24 h as well as untreated cells were collected to quantify cytokines and nitric oxide assays. Cytokine assessment was carried out using human Th1/Th2 cytokine kit II (Becton Dickinson Biosciences, USA) for simultaneous detection of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and interferon-gamma (IFN-γ). The cytokine measurement was based on the principle of cytometric bead array (CBA) technology and all data were acquired on FACSCalibur platform. CBA utilizes microparticles or beads labeled with discrete fluorescence intensity. The capture beads were labeled with allophycocyanin and were read at 650 nm. The detection antibody specific for cytokines was labeled with phycoerythrin fluorochrome which emits at 585 nm on yellow parameters. The intensity of fluorescence of the yellow parameter is proportional to the amount of cytokine present in test samples. Briefly, test samples (50 µL) and phycoerythrin detection antibody were incubated with capture bead reagent for 3 h in the dark at room temperature. All unbound antibodies were washed (1.0 mL kit wash buffer) and resuspended in 300 µL kit fixing buffer before acquisition of data on FACSCalibur platform. Each cytokine had a single and well separated peak and six individual cytokine standard curves (0–5000 pg/mL) were run in each assay. The range of detection was between 3000 pg/mL and 5000 pg/mL in accordance with the manufacturer's instructions.

2.11 In vitro nitrite analysis

The supernatants from cultures of cells incubated or not with polysaccharide at 6 µg/mL for 24 h were used for nitrite analysis by the colorimetric Griess method (Ding et al, 1988). Nitric oxide (NO) concentration was estimated using a standard curve (3.12–100 µmol/mL). The reading was carried out in a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-USA) at 595nm.

2.12 Statistical analysis

Data were analyzed using non-parametric tests. Before analysis, samples data were evaluated using Kolmogorov-Smirnov test for indicates if samples showed Gaussian distribution. To detect the differences between groups, the Wilcoxon test was used. All results were expressed as mean \pm SD and a value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Resultados e discussão

3.1 Caracterização do polissacarídeo

A partir da extração do precipitado solúvel coletados da macroalga vermelha, são apresentados abaixo os seguintes espectros para a região compreendida entre 750 e 4000 cm^{-1} (Figura 1).

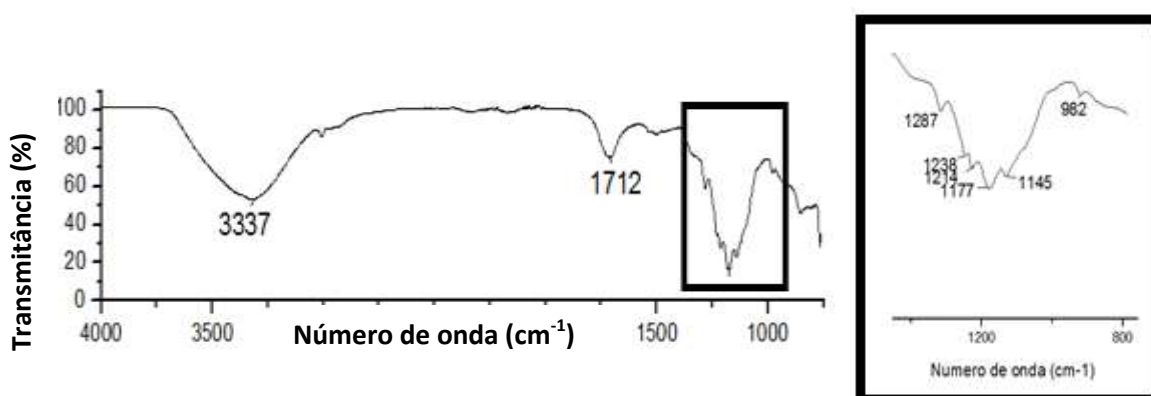


Figura 1: Espectro da região do infravermelho ($4000\text{-}750\text{cm}^{-1}$) das frações polissacarídicas sulfatadas da *B. occidentalis*

Absorções compreendidas entre a região de 3000 cm^{-1} são característicos de grupos funcionais OH. Os picos de 1700 cm^{-1} refere-se a ligação C=O. Ampliando a região compreendida entre $800\text{ e }1500\text{cm}^{-1}$ destaca-se grupos funcionais da região entre $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$ referentes à ligação C-O. **Absorções** características específicas de polissacarídeos sulfatados como já foram demonstrado nas absorvâncias entre $1660\text{ e }1220\text{ cm}^{-1}$.

A partir da análise de infravermelho é possível deduzir que o método de extração abordado foi capaz de isolar o polissacarídeo em análise. A análise elementar da amostra apresenta as seguintes porcentagens dos macroelementos: Carbono (21,44%), Hidrogênio (3,88%), Enxofre (8,33%) e Nitrogênio (0,72%), comprovando que a amostra apresenta porção sulfatada. Os teste para a elucidação estrutural em RMN permitiram identificar o composto isolado como uma carragenana (**FIG. S1**) de estrutura (-4-a-D-Galp-133-b-DGalp-13), assim como o HSQC de $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ 2D (**FIG. S2**) e o

espectro de TOCSY em 2D de $^1\text{H}/^1\text{H}$ 2D (**FIG S3**). Estes testes comprovam que o polissacarídeo já fora isolado e identificado anteriormente por Farias & cols. (2000).

3.2 Avaliação citotóxica frente a células cancerígenas

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade realizados nas linhagens neoplásicas HEP-2, MCF-7 e K562, indicaram que o polissacarídeo extraído da *Botryocladia occidentalis*, apresentou moderado potencial citotóxico (38%) para Leucemia mielocítica crônica, (K-562), (22%) para adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e (27%) para o carcinoma de laringe humana (HEP-2). Alguns carboidratos induzem uma quantidade enorme de atividades biológicas, como anticoagulantes, cofator para crescimento, quimiocina, sinalização celular entre outras (DELATTRE et al., 2005). Quando testado frente à linhagem de células humanas extraídas do sangue periférico (PBMC), o polissacarídeo apresentou citotoxicidade de forma dose-dependente, sendo indutor de apoptose e necrose significativas em 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 2**).

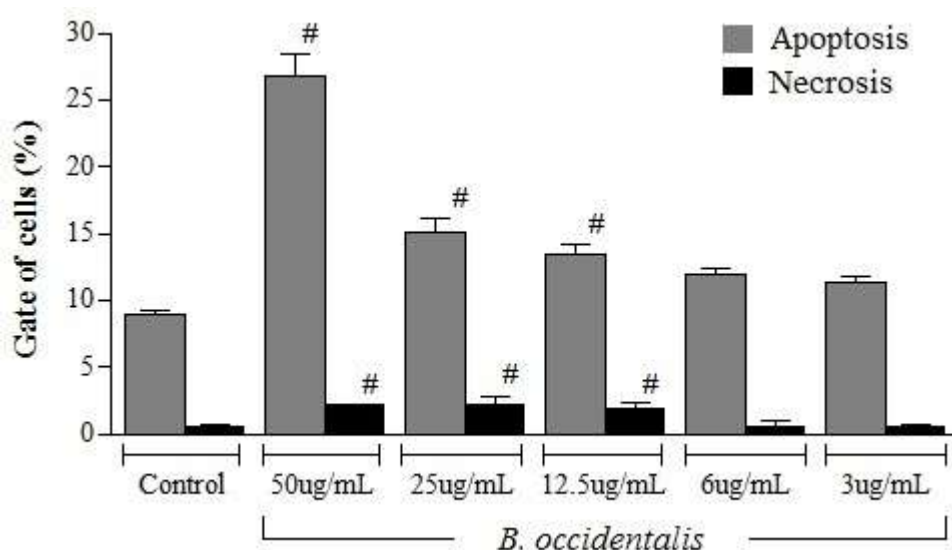


Figura 2: Efeitos da viabilidade celular de linfócitos humanos tratados com polissacarídeo em diferentes concentrações. A dose de segurança a utilizar é inferior a 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Os valores apoptóticos e necróticos encontrados nas células tratadas foram semelhantes às células de controle (células + meio) em 6 e 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicado. # P = 0,03

Foi demonstrado que polissacarídeos extraídos de alga, como a fucoidana, inibem a expressão e secreção do fator de crescimento endotelial vascular e alguns polissacarídeos são capazes de suprimir a neovascularização de células de sarcoma em implantes de ratos [14]

A literatura de compostos bioativos extraídos e verificados como citotóxicos sobre células cancerígenas é ampla em relação a algas vermelhas; a alga vermelha *Gracilaria lemaneiformis* inibiu a proliferação de células tumorais de fígado do tipo H22 e exibiu notáveis atividades imunomoduladoras, o composto bioativo pertence à classe das galactoses, um polissacarídeo ácido.[15]

Em outros artigos as células T estimuladas com o polissacarídeo da λ -carragenana aumentaram a produção de citocinas (TSUJI et al., 2003). Após o ensaio citotóxico frente às células normais, uma concentração baixa do polissacarídeo sulfatado, não indutora de nenhum tipo de morte celular em células de PBMC, foi usada para investigação do possível perfil imunomodulador do composto. Os resultados demonstraram que o polissacarídeo em análise, foi capaz de induzir a produção apenas de TNF- α (Figura 3).

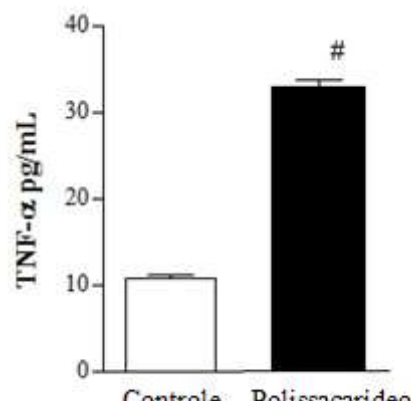


Figura 3: Perfil da produção de TNF- α promovido pelo polissacarídeo em culturas de linfócitos humanos em 24 horas de ensaio. O polissacarídeo foi capaz de produzir maior TNF- α em relação às células de controle. As barras horizontais representam a média de seis experimentos independentes realizados em duplicado. # P = 0,03

O TNF- α pode se produzido por diversas células: linfócitos, macrófagos e monócitos e podem induzir a apoptose celular. Este resultado demonstraram que o polissacarídeo extraído torna-se citotóxico para a concentração de 10pg.ml, contudo já fora demonstrado que o TNF- α quando liberado em baixas concentrações podem agir nas células endoteliais, estimular a produção de outras citocinas e apresentar ação quimiotóxica e na sinalização tumoral (VITALE & RIBEIRO, 2007; WAJANT et al., 2003).

Os polissacarídeos sulfatados podem oferecer proteção contra a degradação proteolítica, assim como prolongar o tempo de meia vida das citocinas e aumentar a atividade biológica dentro dos tecidos (Clarke et al., 1995). Alguns anti-inflamatórios não-esteroidais inibem parcialmente a

hiperalgesia na inflamação quando induzidas com carragenina e a cascata de citocinas precede após esta indução (NAKAMURA; FERREIRA, 1987). A hiperalgesia induz a formação do hormônio peptídico, bradicinina, e que estimula a liberação de TNF- α e conseqüentemente de outras citocinas (CUNHA et al., 1982).

Estudo com a alga vermelha *Gracillaria crinale* revela que a galactana sulfatada extraída apresenta mecanismos que não envolvem a bradicinina, sugerindo que neste trabalho o TNF- α pode ser induzindo segundo a inibição da enzima COX-2 ou através da liberação/ação de eicosanóides em atividades antiinflamatórias segundo Souza (2010). Algumas citocinas como IL-2, IL-7 e INF- λ mostaram que podem interagir com polissacarídeos sulfatados da alga verde *Codium fragile* (NIKA et al.; 2003). Isso denota que as algas produzem polissacarídeos sulfatados que induzem respostas imunológicas diferentes já que o do presente artigo induziu apenas a formação de TNF- α , na espécie *Botryocladia occidentalis*. Outros polissacarídeos sulfatados como a λ - carragenana podem reduzir as ações alérgicas, devido a redução na IgE (Jiao et al., 2011)

Diante do observado e segundo Choi & cols. (2005) sugere-se que existam evidências de polissacarídeos sulfatados que aumentam a citotoxicidade celular e a resposta celular contra tumores.

4. Conclusões

Diante dos resultados expostos conclui-se que o polissacarídeo extraído da *Botryocladia occidentalis* trata-se de uma carragenana já identificada na literatura. A atividade citotóxica deste material no presente estudo constatou citotoxicidade baixa para todas as linhagens celulares tumorais testadas. Estes resultados sugerem que a galactana sulfatada da alga marinha *Botryocladia occidentalis* pode ser utilizada na elaboração de novas substâncias com grande potencial anti-inflamatório e analgésico em concentrações baixas, mas foi tóxica para linfócitos humanos.

5. Agradecimentos

À SUDENE pelo suporte financeiro. We also would like to thanksfor the technical assistance of Mr. Mineo Nakazawa of Immunoparasitology Laboratory of Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Pernambuco, Brazil and to Nucleus of Technological Platforms (NPT-1) located of Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM).

6. Referências

- [1], E.C.O. Filho 1981. A Exploração de algas marinhas no Brasil: situação atual e perspectivas futuras. *Phycol.lat.-amer.* 1: 5-18.
- [2] C.M. Oriens the effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant–herbivore interactions. *American Journal of Botany* 87(2000): 1749–1756.
- [3] E.C Vidotti, M.D.C.E Rollemberg. Algae: From aquatic environment economy to bioremediation and analytical chemistry. *Quim Nova* (2004) 27: 139-145.
- [4] M. G. Pereira, N.M. Benevides, M.R. Melo, P.A. Mourão. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. *Carbohydrate Research*, v. 340, (2005) 2015- 2023, 2005
- [5] Instituto Nacional do Cancer, INCA. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>, 2016 (acessado em 09/08/03).
- [6] F.R. Stevan, M.B. Oliveira; D.F. Bucchi, Nosedá, M. Iacomini, M.E. Duarte. Cytotoxicity effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. *J Submicrosc CytolPathol.* 59 (2001) 477-484
- [7] A. Synytsya, W.J. Kim, S.M. Kim, R. Pohl, A. Synytsya, F. Kvasnicka, C J. Copikova, Y. Park Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydr Polym* 81 (2010) 41-48.
- [8] H .B. Nader.; M. A. S. Pinhal; E. C. Baú; R. A. B. Castro; G. F. Medeiros; S. F. Chavante; E. L. Leite; E. S. Trindade; S. K. Shinjo; H. A. O. Rocha; I. L. S. Tersariol; A Mendes.; C. P. Dietrich Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*34. (2001) 699-709
- [9]W.R.L. Farias, A.P. Valente, M.S. Pereira, P.A.S. Mourão. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, 275, (2000) 29299-29307

- [10] J.A.G. Rodrigues, W.R.L. Farias. Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas *Haymenia spp.* : Ferramenta taxonômica para algas Ver. Bras. Enga. Pesca. 4. (2009).
- [11] T. D.S. Silva. Atividade antitumoral in vitro e in vivo do ácido salazínico isolado de *Ramalina complanata* (Sw.) Ach. (líquen), 2014.
- [12] S. Kannan,. FT-IR and EDS analysis of the seaweeds *Sargassum wightii* (brown algae) and *Gracilaria corticata* (red algae). Int. J. Curr. Microbiol. 3, (2014) 341–351
- [13] W.R.L. Farias, A.P. Valente, M.S. Pereira, P.A.S. Mourão. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. Journal of Biological Chemistry, 275, (2000) 29299-29307
- [14] K. Senthilkumar, p. Manivasagan, j. Venkatesan. S. Kwon kim. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. International Journal of Biological Macromolecules 60 (2013) 366–374
- [15] A. Zong, H. Cao, F. Wang. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. Carbohydrate Polymers 90 (2012) 1395–1410
- Choi E.M., Kim A.J., Kim Y.O., Hwang J.K. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro*. J. Med. Food. 2005;8:446–453.
- CLARKI, D ..KATTOH.O ..GIHII~.R.V ,GRin IfiLS, S.D & GORDm., M.Y. (1995). Interaction of interleukin-7 with glycosaminoglycans and its biological relevance. Cytokine, 7: 325–330.
- CUNHA, F.Q. et al. Interleukin- 8 as a mediator of sympathetic pain. Br. J. Pharmacol.,v. 104, p. 765–767, 1982.
- Delattre, C., Michaud, P., Courtois, B., Courtois, J. (2005), Oligosaccharides engineering from plants and algae applications in biotechnology and therapeutics. *Minerva Biotec.*, 17, 107-117
- Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, H. S.; Cheical structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar Drugs*, 9(2) 196-223, 2011.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 135, p. 145–153, 1987

Nika, K.; Mulloy, B.; Carenter, B.; Gibbs, R. Specific recognition of immune cytokines by sulphated polysaccharides from marine algae. *Eur. J. Phycol.* (August 2003). 38. 257-264.

RAPOSO, M. F. de J.; MORAIS, A. M. B.; MORAIS, R. M. S. C. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar Drugs* 2015 13(5): 2967-3038.

Sousa, A. A. S. Galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (TURNER) LAMOUROUX: respostas na inflamação e nocicepção. Dissertação apresentado ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde .Universidade Estadual do Ceará, 2010.

Tsuji R.F., Hoshino K., Noro Y., Tsuji N.M., Kurokawa T., Masuda T., Akira S., Nowak B. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. *Clin. Exp. Allergy.* 2003;33:249–258.

Vitale, R. F.; Robeiro, F. A. Q. O papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Rev. Bras. otorrinolaringol.* V. 73, n.1, 2007.

WAJANT, h.; PFIZENMAIER, k.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10(1) 45-65, 2003.

Material Suplementar

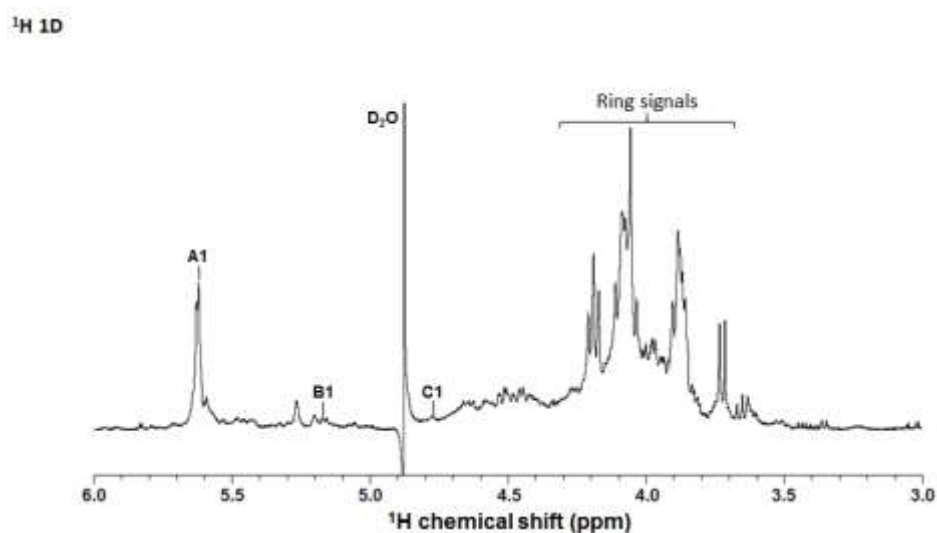


FIG. S1. ^1H NMR spectra at 500 MHz of the native galactan from *B. occidentalis*. The spectra were recorded at 37 °C for samples in D_2O solution. Chemical shifts are relative to external trimethylsilylpropionic acid at 0 ppm. The residual water has been suppressed by presaturation. The anomers assigned as A and B refer to those produced by a(1→3) units, whereas those produced by b(1→4) residue is labeled as C.

^1H - ^{13}C 2D HSQC

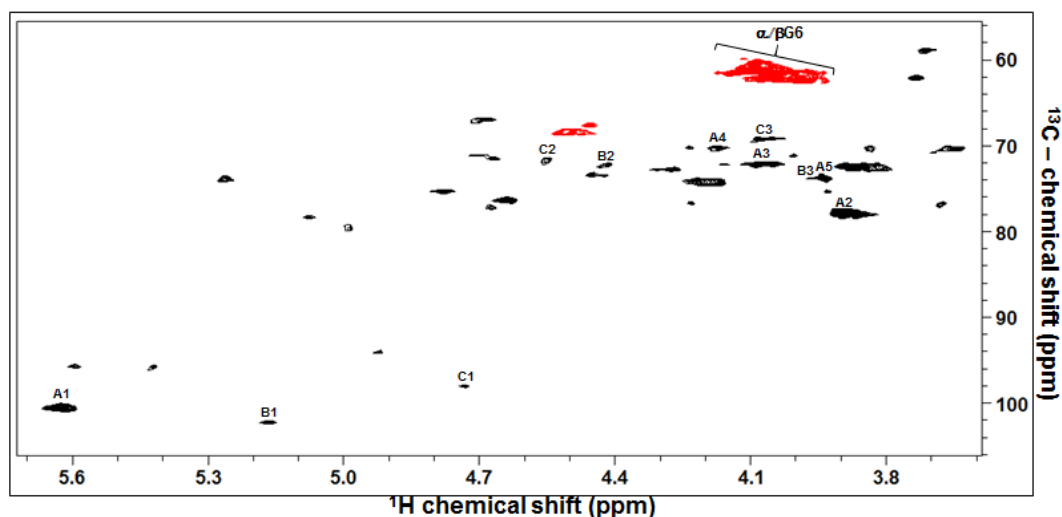


FIG. S2

Table x. $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ chemical shifts for residues of a- and b-galactopyranosides in native galactan extracted from *B. occidentalis*.

Signals ^a	4- α -D-Gal-non(SO_3^-)-1 (residue A)	4- α -D-Gal-2(SO_3^-)-1 (residue B)	3- β -D-Gal-2(SO_3^-)-1 (residue C)
H1/C1	5.62/100.5	5.17/102.2	4.73/97.9
H2/C2	3.89/77.9	4.42/72.1	4.55/71.5
H3/C3	4.07/72.1	3.95/73.7	4.06/69.2
H4/C4	4.17/70.1	-	-
H5/C5	3.93/73.7	-	-
H6/C6	3.65/70.1	-	-

A complexidade da amostra impede uma caracterização estrutural acurada. Além disso seria necessário realizar a desulfatação completa da amostra para analisar o esqueleto de carbono total de ambos os resíduos da α - e β -galactopiranosose. Os sinais destacados em negrito correspondem à alguns pontos de sulfatação localizados. Os sinais destacados em vermelho era para estarem com

deslocamento de próton em campo mais baixo dos quais foram detectados para confirmar a 2,3-disulfatação desse resíduo, porém isso não foi detectado o que indica uma possível dessulfatação desse resíduo durante o processo de purificação. O uso de alguns solventes orgânicos e aquecimento à 100 °C podem causar a dessulfatação de polissacarídeo sulfatados

^1H - ^1H 2D TOCSY

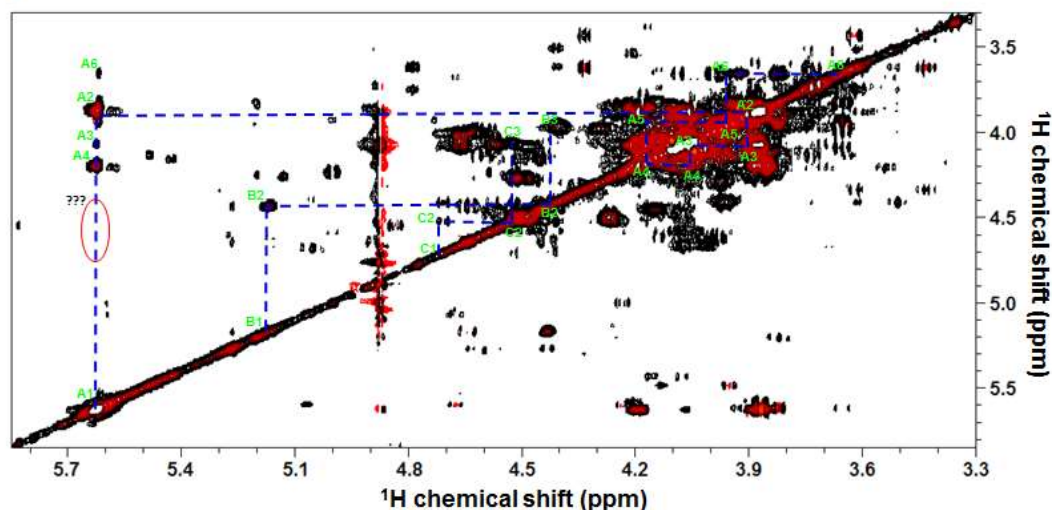


Fig. S3. $^1\text{H}/^1\text{H}$ 2D TOCSY spectra of native galactan from the red algae *B. occidentalis* at 500 MHz, 37 °C, in D_2O . The spins systems for a-unit and b-units are show as dashed lines. The native galactan show a very complex spectrum but it shows unambiguous cross-peaks of residue B and C from H1 to H2 and H3. The high intensity of residue A allowed a complete signaling.

Os sinais correspondentes ao H2 (~4,64ppm) e H3 (~4.43ppm) que correspondem aos ^1H ligados aos carbonos 2SO_3^- e 3SO_3^- , respectivamente não aparecem no espectro para o resíduo A, os mesmo apareceram com deslocamentos em 3.89 e 4.07 ppm respectivamente, propavelmente ocorreu a dessulfatação desse resíduo de galactose em ambas posições.



APÊNDICE B

Avaliação química, antioxidante, antimicrobiana e citotóxica de macroalgas vermelhas do litoral Pernambucano

Chemical, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic evaluations of red algae from Pernambuco Littoral

Brunna Fernanda Lira Patriota¹; Beatriz Santana Rocha¹; Rafael Jorge Santos Aracati Padilha¹; Edson Renan Barros de Santana¹; Leyliane de Cássia Rodrigues Nerys¹; Maria Elizabeth Bandeira Pedrosa⁴; Jeymesson Raphael Cardoso Vieira; Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena²; Ricardo Yara³ e Cláudia Sampaio Andrade Lima¹.

¹Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

³Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife-PE, Brasil

⁴Departamento de Biologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 – Recife-PE, Brasil

claudia.salima@gmail.com

(Recebido em dia de mes de ano; aceito em dia de mes de ano)

O Estado de Pernambuco é bastante conhecido por possuir uma vasta fauna e flora marinha. Há uma ampla diversidade de espécies de algas, podendo existir em forma de bentos (fixos) ou plânctons (suspensos na água). As algas possuem grande importância ecológica, já que são produtores primários, e por isso mantêm toda a biodiversidade marinha. Segundo a literatura, várias espécies apresentam relevantes metabólitos que já são utilizados na área cosmética, alimentícia e farmacêutica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e o perfil químico de algas vermelhas coletadas no litoral pernambucano. Foram selecionadas três rodofíceas (*Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kylin, *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh). A análise antimicrobiana foi realizada frente a representantes de bactérias Gram-Positivas, Gram-negativas, álcool-ácido resistentes e leveduras através do método de difusão em disco. As algas *D. simplex* e a *G. caudata* apresentaram uma discreta atividade frente a *Staphylococcus aureus*. A atividade antioxidante pelo método do DPPH evidenciou moderada atividade antioxidante independente da concentração testada do extrato. No teste de citotoxicidade frente a células HeLa (adenocarcinoma cervical) observou-se uma discreta atividade pela *D. simplex* (37,99%), seguido de *G. caudata* (14,53%). *B. occidentalis* não apresentou nenhum efeito citotóxico frente à linhagem HeLa.

Palavras-chave: Antimicrobianos, antioxidante, citotoxicidade

Pernambuco State has a very rich marine ecosystem, with a wide diversity of species of algae, that exist in the form of benthos (fixed) or plankton (suspended in water). The algae has an important ecological value, since they are the primary producers, and maintain all the marine biodiversity. According to the literature, several species present relevant secondary metabolites that are already used in the cosmetic, food and pharmaceutical areas. This work evaluates the antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activity and chemical profile of red algae collected on the Pernambuco coast. Three macrophytes (*Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kylin, *Gracilaria caudata* J.Agardh and *Digenea simplex* (Wulfen) C.Agardh) were selected. The antimicrobial analysis was performed against representatives bacteria of Gram-Positive, Gram-negative, alcohol-acid resistant and yeast by the disc diffusion method. The algae *D. simplex* and *G. caudata* showed a discreet activity against *Staphylococcus aureus*. The antioxidant activity by the DPPH method showed a moderate antioxidant activity, independent of concentration evaluated of the extracts. In the cytotoxicity test against HeLa cells (cervical adenocarcinoma), it was observed a discrete activity by *D. simplex* (37.99%) and *G. caudata* (14.53%). *B. occidentalis* had no cytotoxic effect against HeLa.

Keywords: Antimicrobials, antioxidant, cytotoxicity

1. INTRODUÇÃO

O litoral de Pernambuco é conhecido por sua exuberância na fauna e flora marinha. Anualmente, novas espécies vêm sendo descobertas no ambiente marinho [1], e as algas têm grande destaque neste ecossistema, pois são consideradas indicadores ambientais para o ambiente marinho, além de fornecerem alimentação para a vida náutica e humana, devido ao seu alto teor proteico, elevada quantidade de fibras, e sais minerais [2].

As algas são utilizadas em diversos setores industriais, como suplementos alimentares, em cosméticos e na produção de fármacos [3]. Além disso, mediante seu efeito terapêutico, propriedades biológicas como: antioxidante [4], anticoagulante [5], antitumoral, anti-inflamatória [6], antiviral [7], antibacteriana [8] e antifúngica [9], são continuamente estudadas, sendo os metabólitos secundários os principais responsáveis por essas atividades biológicas [10].

Os produtos naturais marinhos e a busca de novos agentes antimicrobianos e anticâncer são bastante explorados, devido ao aumento da resistência microbiana e do número de casos de tumores malignos, respectivamente [11, 12]. Diante da busca de novos produtos que contenham ação biológica, as macroalgas se tornam mais acessíveis financeiramente e economicamente à população do que os medicamentos sintéticos, e fornecem uma gama de estruturas químicas a serem descobertas e que podem debelar vários problemas de saúde [13, 14]. Além disso, substâncias antioxidantes têm o poder de impedir ou até mesmo de retardar o desenvolvimento do envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, diabetes, catarata e câncer [15, 16]. A atividade antioxidante costuma estar relacionada a compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e até mesmo proteínas e polissacarídeos presentes em algas marinhas [17, 18, 19].

Devido à variedade de algas existente no Estado de Pernambuco e os benefícios já relatados sobre as substâncias isoladas das algas marinhas, o objetivo deste trabalho é avaliar o perfil químico, antioxidante, antimicrobiano e citotóxico das algas marinhas rodofíceas encontradas no litoral Pernambucano: *Digenea simplex* (Wulfen), *Botryocladia occidentalis* (Børgesen) Kylin e *Gracilaria caudata* J.Agardh.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, armazenamento e produção do extrato bruto

As coletas foram realizadas nas praias de: Boa Viagem (8°07'58.0"S 34°54'00.0"W), Maracaípe (8°32'23.0" S 35°00'07.6"W) e Itamaracá (7°46'33.9"S 34°49'57.1"W), no litoral Pernambucano, em maré baixa 0,1m ou na faixa de areia. As algas *G. caudata* e *B. occidentalis* foram coletadas nos meses de setembro e dezembro de 2012, respectivamente, e *D. simplex* foi coletada em agosto de 2013. Após as coletas, as espécies foram levadas em sacos e caixas de isopor para o laboratório de Biofísica Química da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e depois lavadas em água corrente para a retirada de detritos e outras impurezas. As algas foram postas para secar na estufa à 42°C com circulação forçada de ar. Depois de completamente secas, foram trituradas, pesadas e embebidas em solução hidroalcoólica a 70%, permanecendo por sucessivas 48 horas até esgotamento, foram preparados os extratos hidroalcoólicos de *B. occidentalis* (EHABo), *G. caudata* (EHAGc) e *D. simplex* (EHADs). Em seguida, o extrato fluido foi submetido à destilação a vácuo em evaporador rotativo (RV 10 Control da IKA), com temperatura máxima de 45° C e disposto em dessecador até peso constante. O rendimento dos extratos das algas foi calculado segundo a fórmula de Okibo et al. (2009) [20]:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Peso do extrato obtido (g)} \times 100}{\text{Peso da amostra (pó seco) utilizada (g)}}$$

Prospecção química

Foram realizados testes qualitativos para a pesquisa de saponinas e o teste para a pesquisa de fenóis e taninos de acordo com Matos (1997) [21]. Para a identificação de Saponinas: 1,0 ml de solução do extrato hidroalcoólico foi diluído em 9,0 ml de água destilada e agitado vigorosamente. A presença de espuma determinou a presença de saponinas. Para identificação de Fenóis e taninos: Os extratos foram tratados com 3-4 gotas de uma solução de cloreto férrico (5%). Qualquer variação na coloração indicou a presença de fenóis; e a formação de precipitado azul ou verde foi sugestivo para a presença de taninos.

Atividade antioxidante

A partir dos extratos hidroalcoólicos foram preparadas as soluções nas seguintes concentrações: 1000, 500, 200, 100 e 50 µg/mL. Um controle negativo foi feito pela adição de etanol e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e o controle positivo foi feito pela adição de solução de um padrão (ácido ascórbico) e DPPH. Adicionou-se a cada concentração de extrato hidroalcoólico uma solução de DPPH 300 µM, exceto no branco, onde foi adicionado o solvente. Após a adição do DPPH nos extratos, esperou-se 30 minutos em um ambiente sem incidência direta de luz, e em seguida, procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 515 nm. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando o cálculo do IC 50, baseado na equação da reta dos valores das absorbâncias, onde o valor de γ foi substituído por 0,5 (50%) e a porcentagem antioxidante de eliminar o radical DPPH foi calculada utilizando-se a seguinte equação [22]:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{A(\text{controle}) - A(\text{amostra})}{A(\text{controle})} \times 100$$

Onde:

A (controle): absorbância da solução de DPPH sem a amostra

A (amostra): absorvância da amostra com o DPPH

Atividade antioxidante (50%): $Y = Ax + B$

Teste Antimicrobiano

Os testes para a determinação da atividade antimicrobiana foram realizados de acordo com o método de difusão em disco [23], com modificações, segundo o Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA), com os seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Mycrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007). Foram utilizados 200 mg do extrato de cada espécie de alga analisada, e para a diluição foi utilizada uma solução de 2 mg/ml de DMSO em seguida, 20 µL das amostras foram distribuídas em discos de papel de filtro esterilizados de 6 mm de diâmetro. Paralelamente uma suspensão contendo 10^8 UFC/mL de cada inóculo, diluído em solução salina correspondente a 0,5 na escala de McFarland foram semeados em meio ágar Muller-Hinton (g/L): extrato de carne 30; caseína hidrolisada 17,5; amido 1,5; agar 17 e pH final 7,3 e GL (g/L): peptona 10; extrato de carne 3; NaCl 5; extrato de levedura 10; glicose ou dextrose 10; agar 15 e pH final de 7,0; com um swab estéril. Os discos contendo os extratos foram depositados sobre o meio de cultura correspondente para cada micro-organismo. As placas foram colocadas em geladeira por 20 minutos (para início da difusão antes do crescimento de cada micro-organismo) e em seguida, incubadas a 35°C durante 24 horas (bactérias) e a 30°C durante 24-48 horas (levedura), posteriormente, e foi realizada a observação e medição dos halos. Os controles positivos utilizados foram: Ciclofosfamida (CTX), Cefoxitina (CFO) e Clorafenicol (CLO). O controle negativo foram placas com apenas os micro-organismos. Os testes foram realizados em triplicate.

Ensaio Citotóxico

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada utilizando o método MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-tetrazolium diphenyl) [24, 25]. A metodologia utilizada para realizar este teste seguiu as regras da International Standard Organization (ISO) 10993-5 (2009) [26]. Assim, as células na concentração de 1×10^4 / mL em meio DMEM por poço foram distribuídas em placas de 96 poços (TPP, Darmstadt, Alemanha) e incubadas durante 72 horas a 37 ° C numa incubadora celular com atmosfera enriquecida a 5% de CO₂ e 95% de ar para estabilização. Após este período, os extratos hidroalcoólicos de algas, previamente dissolvidos em álcool e filtrados (filtro de seringa de 0,22 µm - TPP, Darmstadt, Alemanha) em concentração de 50 µg / mL foram adicionados aos poços com as células HeLa. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo e o meio de cultura celular foi o controle negativo. Após a incubação durante 24 horas de contato das células com o extrato, foram adicionados 25 µl (5 mg / mL) de solução de MTT a cada poço e a placa foi incubada durante 3 horas. O MTT e o meio de cultura foram então removidos e foram adicionados 25 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço para dissolver os cristais de formazan. Subseqüentemente, a análise da atividade citotóxica foi feita baseada nos dados da escala do National Cancer Institute (NCI), onde os compostos são considerados sem atividade citotóxica quando a inibição percentual apresenta-se no intervalo de 1 - 20%, com pouca atividade quando essa percentagem situa-se entre 20 e 50%, atividade moderada quando a inibição é de 50 para 70% e de alta atividade, quando o intervalo de inibição fica entre 70 a 100%. [27]. A absorvância foi lida após dissolução do precipitado com 100 µL de DMSO em espectrofotômetro de placas a 560 nm [28]. Os experimentos foram realizados em triplicata e o percentual de inibição foi calculado através do programa GraphPadPrism 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise do rendimento e avaliação química

EHABo apresentou o maior rendimento de extração (1,20%), seguido de EHAGc (0,88 %) e EHADs (0,77 %). Neste trabalho, a alga *G. caudata* apresentou um rendimento de 0,88%, inferior a outros extratos hidroalcoólicos de algas do mesmo gênero relatados [29, 30]. Já a alga *B. occidentalis* é bastante citada na literatura devido à importância atribuída aos seus metabólitos primários e polissacarídeos sulfatados. Torres et al. (2005) [31], no estado do Ceará, no Brasil, verificaram o melhor rendimento em extratos metanólicos (2,4%), possivelmente pelo fato do metanol ter menor hidratação que álcool etílico, e provavelmente, é possível extrair maior quantidade de compostos fenólicos, como os flavonoides e os taninos [32]. Também foi verificado um baixo rendimento de extração relacionado à *D. simplex* em relação a trabalhos anteriores, como o que foi realizado por Al-Amoudi et al. (2009) [33]. O ácido caínico foi relatado como a principal substância já isolada em *D. simplex*, e o rendimento relatado para produção de extratos foi entre 0,7% e 6% [34]. Observa-se que é evidente a importância que a metodologia de extração utilizada, o local de coleta e a sazonalidade são fatores determinantes para o rendimento extrativo nessas espécies [36, 37, 38, 39 40]. Os metabólitos secundários são substâncias liberadas por espécies vegetais responsáveis pela proteção e disseminação de novas espécies, além da ação contra predadores e o estresse causado pelas condições ambientais [41]. Estes metabólitos secundários são confirmados a partir das reações químicas de precipitação ou mudança de coloração que são observados nos testes químicos qualitativos [42]. Nos testes químicos, foi detectada a presença de saponinas nas algas *G. caudata* e *D. simplex*. Fenóis e taninos não foram detectados em nenhuma das três espécies. Em relatos anteriores, foram detectadas flavonoides, alcaloides, fenóis e taninos, além de saponinas nas espécies *D. simplex* e *G. caudata* e foram atribuídas atividades antimicrobianas e antioxidantes a estes glicosídeos [37, 38, 39, 40, 41, 42]. Foram relatados compostos fenólicos ou tânicos em *D. simplex* [43] e em *G. edulis* [44].

Avaliação antimicrobiana

Os extratos EHADse EHAGc apresentaram ação antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, conforme mostrado na **tabela 1**.

Tabela 1: Avaliação antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos

Espécies	Micro-organismos analisados (média de halos)								
	1	6	16	3 9	71	138	224	398	1007
<i>D. simplex</i>	11,00±0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. caudata</i>	10,33±1,15	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. occidentalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CTX	34	-	25	2	-	-	38	36	-

			2			
CFO	36	36	-	-	30	26
CLO	32	33	1 7	15	30	14

Legenda:(-): Ausência de inibição; *Staphylococcus aureus* UFPEDA 1; *Bacillus subtilis* UFPEDA 6; *Bacillus subtilis* UFPEDA 16; *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 39; *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71; *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138; *Escherichia coli* UFPEDA 224; *Serratia marcescens* UFPEDA 398; *Candida albicans* UFPEDA 1007; ±: Desvio padrão; -: Sem apresentação de halo; CTX: Ciclofosfamida; CFO: Cefoxitina; CLO: Clorafenicol.

O extrato EHADs apresentou maior atividade de inibição frente a bactéria Gram-positiva, *S. aureus*, com um halo de 11 mm, resultados semelhantes foram determinados anteriormente [30]. No entanto, Ibraheem et al (2017) [38], no Egito, verificaram para a mesma alga, inibição de 17 mm frente a *S. aureus*. Em extrações com diclorometano, foi observada uma discreta atividade antimicrobiana (6-8 mm) por Bianco et al., 2013 [45]. Foram relatadas adicionalmente para *D. simplex*, atividade antifúngica [33, 34]. *D. simplex* é bastante conhecida pela alta concentração de ácido cálnico, que possui múltiplas atividades biológicas, principalmente neuroprotetora e anti-helmíntica [35, 46], sendo este composto o provável agente antimicrobiano. EHAGc apresentou um halo de inibição sobre *S. aureus* de 10,33 mm. Este resultado está de acordo com outras espécies desse gênero, segundo Freíle-Pelegrín (2004) [47], no México, o extrato etanólico de *G. caudata* apresentou atividade antibiótica sobre importantes patógenos, como *B. subtilis* e *M. luteus*, com halos de 12 e 10 mm, respectivamente. Outra espécie, como o extrato alcoólico da *G. edulis* inibiu o crescimento de *S. aureus*, apresentando 13,7 mm como halo de inibição [48]. Não foi observada nenhuma atividade antimicrobiana em EHABo e a literatura relaciona a ação biológica desta alga vinculada aos metabólitos primários e aos polissacarídeos sulfatados presentes nesta espécie, como descrito por Farias et al. (2000) que verificaram uma marcante atividade anticoagulante e antiofídica contra *Crotalus durissus cascavella* [49].

Atividade Antioxidante

DPPH

Os extratos das macroalgas vermelhas foram avaliados quanto a sua capacidade de sequestrar radicais livres de DPPH [43, 44]. Os extratos avaliados não apresentaram uma variação antioxidante significativa entre as 3 espécies testadas e a ação não foi dependente da concentração do extrato. As algas vermelhas apresentaram moderada atividade antioxidante com valores compreendidos entre 54 e 41% (para concentrações de 1000µg/ml), apesar dos resultados serem semelhantes, *D. Simplex* apresentou uma marcante ação antioxidante na maior e menor

concentração avaliadas 51,05% e 42,74%, respectivamente, com IC₅₀ de 24,23 µg/mL; em seguida, a *G. caudata*, apresentou atividade oxidante de 49,35% na maior concentração e 41,85%, na menor concentração, com IC₅₀ de 26,38 µg/mL. *B. occidentalis* apresentou a menor atividade antioxidante dentre as três algas rodofíceas, com 45,72% na maior concentração e 36,42% na menor concentração, com IC₅₀ de 19,23 µg/mL.

A atividade antioxidante de espécies de *Gracilariasp.* são conhecidas na literatura, o extrato etanólico de *G. edulis* apresentou atividade antioxidante no teste do DPPH de 73,81% na concentração de 1 mg/ml [50]. Os polissacarídeos sulfatados encontrados no gênero *G. caudata* foram relacionados às atividades biológicas como antioxidante e gastroprotetora [51, 52]. Da mesma maneira ocorre com a rodofícea *B. occidentalis*, onde foram descritas frações de polissacarídeos sulfatados com atividade anti-trombótica e anti-ofídica frente a *C. durissus cascavella* [49]. Este é o primeiro relato científico sobre avaliação da atividade antioxidante para extrato bruto de *B. occidentalis*. O extrato metanólico da alga *D. simplex* no teste do DPPH no trabalho de Al-Amoudi et al, (2009) [33], apresentou atividade antioxidante de 41% em 1 mg/mL de extrato, a atividade de *D. simplex* observada neste trabalho foi de 51%.

Avaliação Citotóxica

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade realizados com as linhagens neoplásicas Hela, indicaram que o EHADs apresentou uma discreta citotoxicidade(38%). EHAGc (18%) e EHABo (10%) não apresentaram efeito citotóxico. Já foram relatados anteriormente, o efeito inibitório de extratos de algas frente a linhagem HeLa, com extrato metanólico de *B. Occidentalis* que apresentou atividade inibitória em cerca de 20%[28], enquanto que algumas espécies do gênero *Gracilaria sp.*apresentaram citotoxicidade inferior a 50%.

4. CONCLUSÃO

As algas *Digenea simplex* e *Gracilaria caudata* apresentaram uma discreta atividade frente a *Staphylococcus aureus*. A atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH evidenciou uma moderada atividade, independente da concentração do extrato nas três algas avaliadas. Para a avaliação de citotoxicidade frente a células HeLa, observou-se uma discreta atividade em *D. simplex* (37,99%) e *G. caudata* (14,53%). *Botryocladia occidentalis* não apresentou nenhum efeito citotóxico frente à linhagem HeLa.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Tecnológico das Cadeias Biossustentáveis (ITCBio) e à Superintendência do Desenvolvimento no Nordeste (SUDENE) por todo suporte.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smit AJ. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweeds natural products: A review. *Journal of applied phycology*. 2004 16: 245–262.
2. Vasconcelos BMF, Gonçalves AA. Macroalgas e seus usos–alternativas para as indústrias brasileiras. *Revista verde (Mossoró-RN-Brasil)*. 2013 Dezembro;8(5):125-140, doi: <http://revista.gvaa.com.br>.
3. Cabral ISR, Shirahigue LD, Arruda LF, Carpes ST, Oetterer M. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. *B. CEPPA*. 2011 Jul./dez; 29 (2): 181-192, doi:<http://dx.doi.org/10.5380/cep.v29i2.25481>.
4. Hongayo MC, Larino RC, Malingin DL. Antibacterial and antioxidant effects of brown alga *Padina australis* Hauck crude extract. *IAMURE*. 2012; 2 march (2): 35:70, doi: 10.7718/iamure.ijsc.v2i1.388.
5. Câmara RBG, Costa LS, Fidelis GP, Nobre LTDB, Santos ND, Cordeiro LS et al. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. *Mar drugs*. 2011; 24 jan, 9(1): 124-138, doi:[10.3390/md9010124](https://doi.org/10.3390/md9010124).
6. Quinderé ALG. Propriedades na nocicepção e na inflamação de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha *Acanthophora muscoides* [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará.; 2011. 81 p.
7. Mendes GS, Soares AR, Martins FO, Albuquerque MCM, Costa SS, Valentin YY et al. Antiviral activity of the green marine alga *Ulva fasciata* on the replication of human Metapneumovirus. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2010 Jan/Feb. 52(1): 3-10.
8. Machado FLS, Kaiser CR, Costa SR, Gestinari LM, Soares AR. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Rev. Bras. Farmacogn*. Jun/jul 2010; 20 (3): 441-452, doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300024>.
9. Fedorov SN, Ermakova SP, Zvyagintseva TN, Stonik VA. Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: Some results and prospects.2013. *Mar. Drugs*, 11(12), 4876-4901, doi: [10.3390/md11124876](https://doi.org/10.3390/md11124876).
10. Molinsk TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*. 2009. Jan 8 (1): 69-85, doi: [10.1038/nrd2487](https://doi.org/10.1038/nrd2487).
11. Chin, YW, Balunas, MJ, Chai, HB, Kinghorn, AD. Drug discovery from natural sources. *AAPS J*. 2006. Jun 8 (2): 239-253, doi: [10.1007/BF02854894](https://doi.org/10.1007/BF02854894).
12. Bergmann W, Feeney RJ. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *J. Org. Chem*.1951june; 16 (6), doi: 10.1021/jo01146a023.
13. Delbone CAC, Lando RL. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. X congresso de educação do norte pioneiro; 2010. Campus Jacarezinho. P. 1-9.
14. Araújo MGF, Cunha WR, Veneziani RCS. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.- Hill (Solanaceae).*Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2010; 31(2): 205-09.
15. Wu, YJ, Hong CY, Lin SJ, Wu P, Shiao MS. Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water-soluble antioxidant-rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler. Thomb. Vasc. Biol*. 1998. Mar 18: 481–486.
16. Cuzzocrea S, Riley, DP; Caputi, AP; Salvemini, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Ver*. 2001. V. 53, n.1, p. 135-159.
17. Matanjun P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K, Ming CH. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J. Applied Phycol*. 2008. 20:367-373, doi: 10.1007/s10811-007-9264-6.
18. Sasidharan S, Darah I, Noordin MK. In vitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*. *N. Biotechnol*. 2010 Sep 30;27(4):390-6, doi:[10.1016/j.nbt.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.002).
19. Burtin, P. Nutritional value of seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*. 2003. 2: 498–503.
20. Okibo RN., Annagasi CL., Amadi JE., UkPabi UJ. Potential inhibitory effects of some African Tuberous plant extracts on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida*. *IJIB*. 2009. 6 (2): 91-93.
21. Matos FJA. As plantas das farmácias vivas. Fortaleza: Editora BNB; 1997. 57p.
22. Decker, EA; Welch B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle. *J. Agric. Food Chem*.1990, 38 (3), pp 674–677, doi: 10.1021/jf00093a019.
23. Bauer AW, Kirby WM, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer J Clin Pathol*. 1966; 45 (32): 493- 6.

24. Geran, R.I., Greenberg, N.H., Mac donald, M.M. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*. 3, 1972. P. 208-209.
25. Mosman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, 1983. p. 55-63.
26. ISO 10993-5. International standard: Biological Evaluation of Medical Devices. 2009. Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods.
27. Cocco, MT, Congiu C, Lilliu V, Onnis, V. Synthesis and in vitro antitumoral activity of new hydrazine pyrimidine-5-carbonitrile derivatives. *Bioorganics Medicinal Chemistry*. 2006 v. 14, p. 366-372.
28. Twentyman, PR., Luscombe, MA. Study of some variables in a tetrazolium dye (Mil) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br.J. Cancer*. 1987 56: 279-285.
29. Cardozo, KHM; Marques, LG; Carvalho, VM; Carignan, MO; Pinto, E; Marinho-Soriano, E; Colepicolo, P. Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Rev bras farmacogn*. 2011 March/Apr. 21 (2), doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000047>
30. Faten M. Abou Elalla, Emad, A Shalaby. Antioxidant Activity of Extract and Semi- Purified Fractions of Marine Red Macroalga, *Gracilaria Verrucosa*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2009 3(4): 3179-3185, 1991-8178.
31. Torres MR; Sousa APA; Silva Filho EAT; Pessoa CO; Moraes MEA; Moraes MO; Lotufo LVC. Biological activity of aqueous and organic extracts of seaweeds from Ceará state, Brazil. *Arq. Cien. Mar*. 2005, 38, 55–63.
32. Cechinel V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quimica Nova*, 1998 v. 21, doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421998000100015>.
33. Al-Amoudi OA, Mutawie HH, Patel AV, Blunden G. Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah corniche algae, Saudi Arabia. *Saudi. J Biol. Sci* 2009; 16: 23-9, doi: 10.1016/j.sjbs.2009.07.004.
34. Murakami S, Takemoto T, Shimizu Z. *J. Pharm. Soc.* 1953. Japan, 73, 1026.
35. Sahayaraj K, Asharaja AC, Rajesh SM, Martin Rathi JA. Qualitative and quantitative profiles of secondary metabolites of chosen Chlorophyta and Ochrophyta from Gulf of Mannor. *Cah Biol Mar*. 2014; 55: 69-76.
36. Rhimou, B., Hassane, R., & Nathalie, B. (2013). Antioxidant activity of Rhodophyceae extracts from Atlantic and Mediterranean Coasts of Morocco. *African Journal of Plant Science*, 7(3), 110-117.
37. Murugan K, Iyer VV (2012). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Marine Algae, *Gracilaria edulis* and *Enteromorpha lingulata*, from Chennai Coast. *Int. J. Cancer Res*. 8:15-26.
38. Ibraheem B. M. Ibraheem, Basma E. Abd Elaziz, Abeer Moawad , Hossam M. Hassan, Waleed A. Mohamed, Neveen Abdel-Raouf. Antimicrobial and Anti-inflammatory Effects of Two Different Marine Red Algae Species Collected from Quseir, the Red Sea, Egypt. *Asian Journal of Biology*. 2017 2(2): 1-10.
39. Guedes EAC, Araújo MAS, Souza AKP, Souza LIO, Barros LD, Maranhão FCA et al. Antifungal activities of different extracts of marine macroalgae against dermatophytes and candida species. *Mycopathologia*. 2012. 174: 223-232.
40. Sánchez AI. Variación estacional de La actividad antimicótica de algunas macroalgas de las costas del estado de Veracruz, México (tese). México; 2004
41. Soetan KO, Oyekunle MA, Aiyelagbe OO, Fafunso MA. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorgum Bicolor* L. Moench. *AJB*. 2006; 5(23): 2405-2407.
42. Benhammou M, Ghambaza N, Benabidelkader S, Bekkara-Atik F, Panovska KT. Phytochemicals and antioxidant properties of extracts from the root and stems of *Anabasis articulata*. *IFRJ*. 2013; 20(5): 2057-2063.
43. Echavarria, B., Franco, A. y Martinez, A. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16(1):126–131.
44. Machu, L.; Misurcova, L.; Ambrozova, J. V.; Orsavova, J.; Mlcek, J.; Sochor, J.; Jurikova, T. Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products. *Molecules* 2015, 20, 1118-1133.
45. Bianco, E.M.; de Oliveira, S.Q.; Rigotto, C.; Tonini, M.L.; Guimaraes, T.D.; Bittencourt, F.; Gouvea, L.P.; Aresi, C.; de Almeida, M.T.R.; Moritz, M.I.G.; et al. Anti-Infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. *Molecules* 2013, 18, 5761–5778.
46. Jung YC. A new approach to kainoids: Total syntheses of (-)- kainic acid and (+)- allokainic acid (dissertação). Florida; 2006.
47. Freile-Pelegrín Y, Morales JL. Antibacterial activity in marine algae from the coast os Yucatan, Mexico. 47(1). Berlin- New York: Walter the Gruyter; 2004.

48. Kolanjinathan, K., Ganesh, P., Govindarajan, M.. Antibacterial activity of ethanol extracts of seaweeds against fish bacterial pathogens. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 13, 173-177. 2009.
49. Farias, W.R.; Valente, A.P.; Pereira, M.S.; Mourão, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 29299–29307.
50. Chandramohan A; Divya S.R. Comparison of antioxidant activity in *Gracilaria edulis* and *Hypnea valentiae*. *International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology*. ISSN: 2454-132X Impact factor: 4.295 (Volume3, Issue1)
51. Barros, F.C.N.; da Silva, D.C.; Sombra, V.G.; Maciel, J.S.; Feitosa, J.P.A.; Freitas, A.L.P.; de Paula, R.C.M. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). *Carbohydr. Polym.* 2013, 92, 598–603.
52. Gressler V. *Composição química e potencial biológico das algas vermelhas marinhas Laurencia filiformis, Laurencia intricata, Plocamium brasiliense e Ochtodes secundiramea da costa brasileira (tese)*. São Paulo; 2010.