



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM BIOMEDICINA**

LUCAS HENRIQUE MARQUES RODRIGUES

**Utilização de algas marinhas para a promoção da saúde:
Análise toxicológica de um polissacarídeo sulfatado
extraído de *Solieria filiformis***

Recife
2023

LUCAS HENRIQUE MARQUES RODRIGUES

Utilização de algas marinhas para a promoção da saúde:
Análise toxicológica de um polissacarídeo sulfatado
extraído de *Solieria filiformis*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Renan Oliveira Silva
Damasceno

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Rodrigues, Lucas Henrique Marques.

Utilização de algas marinhas para a promoção da saúde: Análise toxicológica de um polissacarídeo sulfatado extraído de *Solieria filiformis* / Lucas Henrique Marques Rodrigues. - Recife, 2023.

69 p. : il., tab.

Orientador(a): Renan Oliveira Silva Damasceno
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

Inclui referências, anexos.

1. Produtos naturais. 2. Algas marinhas. 3. Polissacarídeo sulfatado. 4. *Solieria filiformis*. 5. Toxicidade aguda. I. Damasceno, Renan Oliveira Silva. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

LUCAS HENRIQUE MARQUES RODRIGUES

**Utilização de algas marinhas para a promoção da saúde:
Análise toxicológica de um polissacarídeo sulfatado
extraído de *Solieria filiformis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 24/04/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renan Oliveira Silva Damasceno - Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Lorena Duarte da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Elifrances Galdino de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha mãe, por ser a luz da minha vida, ao meu pai, por não medir esforços para me ver bem, e à minha avó, por sentir tanto orgulho das minhas pequenas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, e em especial à minha mãe, Silverlanne, e ao meu pai, Cristiano, por sempre me motivarem a estudar, por me incentivarem a dar o meu melhor e por reconhecerem meu esforço e dedicação. Agradeço à minha avó, Nelma, por sempre torcer para que eu conquistasse cada um dos meus objetivos. Vocês são os responsáveis pela pessoa que sou hoje e sou muito grato por tudo.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Renan Oliveira, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pela confiança depositada em mim para desenvolver este e outros projetos em seu laboratório.

Agradeço aos meus queridos amigos de laboratório, João, Lorena, Victoria, Ana e Cecília, por me ajudarem nos experimentos, por me incentivarem a prosseguir e por transformarem momentos especiais em memórias que jamais esquecerei.

Agradeço também a Elifrances, Junior, Ângela e demais amigos e professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia por todo carinho, amizade e parceria que me foram concedidos. Agradeço a Seu Hilde pelos momentos de descontração e pela amizade que criamos com tanto apreço.

Agradeço aos meus queridos amigos de graduação, Marco, Anndressa, Zion, Carlos, Agenor, Almir e Rimaud, por sempre estarem comigo, nos bons e nos maus momentos, e por tornarem essa fase muito mais leve e descontraída. Agradeço também a todos os outros amigos que tive a honra de trocar experiências durante os últimos quatro anos, com certeza me ajudaram muito nessa caminhada.

Agradeço a Nathalia, Jéssica, Luana, Diego, Lucas e tantos outros amigos que a vida me concedeu a oportunidade de conhecer. Vocês fizeram e continuam fazendo a diferença nos meus dias.

Agradeço aos meus amigos de estágio, Henrique, João, Nathaly e Mariana, por dividirem comigo as experiências diárias e por me ajudarem a suportar o cansaço e os desafios da reta final da graduação.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica, permitindo a realização deste projeto de pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que cruzaram o meu caminho nessa jornada e que contribuíram para a realização desse sonho. Muito obrigado.

*“Só se vê bem com o coração, o essencial
é invisível aos olhos.”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

RODRIGUES, Lucas Henrique Marques. **Utilização de algas marinhas para a promoção da saúde:** Análise toxicológica de um polissacarídeo sulfatado extraído de *Solieria filiformis*. 2023. 69p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

As algas marinhas são utilizadas há muito tempo como uma fonte de alimentação saudável devido às suas valiosas propriedades nutricionais. Moléculas extraídas desses organismos se destacam também por suas diversas atividades biológicas. Em estudos anteriores, o polissacarídeo sulfatado de *Solieria filiformis* (PS-Sf) demonstrou uma importante atividade protetora na mucosa gástrica, além de possuir efeitos promissores no sistema cardiovascular, no controle da dor e contra microrganismos patogênicos. Entretanto, dados que comprovem a ausência de efeitos tóxicos ligados à utilização do PS-Sf ainda são escassos. Assim, o presente estudo buscou avaliar a ocorrência de toxicidade aguda pré-clínica do PS-Sf. Camundongos BALB/c machos foram tratados com o PS-Sf (2000 mg/kg), em dose oral única, enquanto o grupo controle recebeu apenas solução salina. Os animais foram monitorados para avaliação do peso corporal e dos aspectos clínicos e, no 14º dia, o sangue foi coletado para avaliações bioquímicas e os órgãos foram fotografados, pesados e coletados para análise histopatológica. Os resultados mostraram que o PS-Sf não afetou o ganho de peso nem o comportamento geral dos camundongos, não havendo ocorrência de letalidade. O peso relativo do coração, baço, rins, fígado e pulmões, bem como seus parâmetros morfológicos, não foram alterados pela administração do PS-Sf. Além disso, a dosagem de biomarcadores e a análise microscópica dos órgãos não revelaram perda de função ou lesões celulares, tanto no grupo controle quanto nos animais tratados com o PS-Sf. Assim, o presente estudo demonstrou que o tratamento com o polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* não promove efeitos de toxicidade aguda em animais experimentais, contribuindo para validar a segurança dos seus efeitos benéficos.

Palavras-chave: Produtos naturais. Algas marinhas. Polissacarídeo sulfatado. *Solieria filiformis*. Toxicidade aguda.

RODRIGUES, Lucas Henrique Marques. **Use of marine algae for health promotion:** Toxicological analysis of a sulfated polysaccharide extracted from *Solieria filiformis*. 2023. 69p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Marine algae have long been used as a source of healthy food due to its valuable nutritional properties. Molecules extracted from these organisms also stand out for their diverse biological activities. In previous studies, the sulfated polysaccharide from *Solieria filiformis* (PS-Sf) demonstrated an important protective activity in the gastric mucosa, in addition to having promising effects on the cardiovascular system, pain control and against pathogenic microorganisms. However, data proving the absence of toxic effects linked to the use of PS-Sf are still limited. Thus, the present study sought to evaluate the occurrence of preclinical acute toxicity of PS-Sf. Male BALB/c mice were treated with PS-Sf (2000 mg/kg), in a single oral dose, while the control group received only saline solution. The animals were monitored to assess body weight and clinical aspects and, on the 14th day, blood was collected for biochemical evaluations and the organs were photographed, weighed and collected for histopathological analysis. The results showed that the PS-Sf did not affect the weight gain or the general behavior of the mice, with no occurrence of lethality. The relative weight of the heart, spleen, kidneys, liver and lungs, as well as their morphological parameters, were not altered by PS-Sf administration. Furthermore, the dosage of biomarkers and the microscopic analysis of the organs did not reveal loss of function or cellular lesions, both in the control group and in the animals treated with PS-Sf. Thus, the present study demonstrated that treatment with sulfated polysaccharide from *S. filiformis* does not promote acute toxicity effects in experimental animals, contributing to validate the safety of its beneficial effects.

Key words: Natural products. Marine algae. Sulfated polysaccharide. *Solieria filiformis*. Acute toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Espécies representativas dos três grupos de algas marinhas	17
Figura 2 Modelo de estrutura da parede celular das algas marinhas	18
Figura 3 Técnicas de extração de polissacarídeos de algas marinhas.....	19
Figura 4 Unidade estrutural das principais carrageninas de algas vermelhas	22
Figura 5 Principais dissacarídeos encontrados nos ulvanos de algas verdes	24
Figura 6 Arranjo em cadeia dos monossacarídeos de fucanos de algas marrons...	25
Figura 7 Principais efeitos provocados por substâncias tóxicas ao organismo	37
Figura 8 Etapas de desenvolvimento de novos compostos bioativos	40
Figura 9 Representação do protocolo experimental de toxicidade do PS-Sf	44
Figura 10 Variação do peso corporal dos animais tratados com o PS-Sf	47
Figura 11 Aspectos morfológicos dos órgãos dos animais tratados com o PS-Sf ...	50
Figura 12 Peso relativo dos órgãos dos animais tratados com o PS-Sf	51
Figura 13 Fotomicrografias dos órgãos dos animais tratados com o PS-Sf	54
Figura 14 Resumo ilustrativo do potencial do PS-Sf para a promoção da saúde	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeitos dos polissacarídeos de algas marinhas em modelos de desordens digestivas.....	27
Tabela 2 Atuação dos polissacarídeos de algas marinhas sobre a homeostasia cardiovascular	29
Tabela 3 Atividades antimicrobianas de polissacarídeos de algas marinhas.....	32
Tabela 4 Ação antinociceptiva de polissacarídeos extraídos de algas marinhas	35
Tabela 5 <i>Screening</i> hipocrático dos animais tratados com 2000 mg/kg do PS-Sf ...	48
Tabela 6 Marcadores bioquímicos de função renal e hepática dos animais tratados com o PS-Sf	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	ácido acetilsalicílico
AINES	anti-inflamatórios não esteroides
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
AT-III	antitrombina III
Ca ²⁺	cálcio
CAT	catalase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DENV	vírus da dengue
DII	doença inflamatória intestinal
EAE	extração assistida por enzimas
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EPM	erro padrão da média
EROs	espécies reativas de oxigênio
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GSH	glutathiona
HC-II	cofator II da heparina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HO-1	heme oxigenase-1
HPSEC	cromatografia por exclusão de tamanho de alta eficiência
HSV	herpes-vírus simples
H&E	hematoxilina e eosina
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-8	interleucina 8
K ⁺	potássio
MAE	extração assistida por micro-ondas
MDA	malondialdeído
Na ⁺	sódio
NF- κ B	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico

Nrf2	fator nuclear eritroide 2
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio 1
PGs	prostaglandinas
PKC	proteína quinase C
PS-Sf	polissacarídeo sulfatado de <i>S. filiformis</i>
RMN	ressonância magnética nuclear
RT	transcriptase reversa
SARS-CoV	coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TGF- β 1	fator de transformação do crescimento beta 1
TGI	trato gastrointestinal
TNBS	ácido trinitrobenzenossulfônico
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRPs	receptores de potencial transitório
TT	tempo de trombina
TTPa	tempo de tromboplastina parcial ativada
UAE	extração assistida por ultrassom
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 ALGAS MARINHAS COMO FONTE DE NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS	16
2.2 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS.....	19
2.3 PROPRIEDADES FÍSICAS E ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS	21
2.3.1 Carrageninas de Algas Vermelhas	21
2.3.2 Polissacarídeos de Outros Tipos de Algas	23
2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	26
2.4.1 Proteção do Trato Gastrointestinal	26
2.4.2 Regulação do Sistema Cardiovascular e da Hemostasia	28
2.4.3 Combate a Doenças Infecciosas	31
2.4.4 Alívio da Dor Neuropática e Inflamatória	34
2.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS	36
2.5.1 Substâncias Tóxicas e seus Efeitos no Organismo	36
2.5.2 Toxicidade do Polissacarídeo Sulfatado de <i>S. filiformis</i>	39
3 OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 METODOLOGIA	43
4.1 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DE <i>SOLIERIA FILIFORMIS</i>	43
4.2 ANIMAIS	43
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	43
4.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL – <i>SCREENING</i> HIPOCRÁTICO.....	44
4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS	44
4.6 ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	45
4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS.....	45
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	69
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE.....	69

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais sempre desempenharam um papel significativo na vida humana, desde seu consumo como forma de alimento até sua aplicação como matérias-primas medicinais (ANDRYUKOV et al., 2020). Assim, pesquisas utilizando organismos marinhos têm seguido a tendência contemporânea de aplicação desses produtos na medicina e para a promoção da saúde, que incluem moléculas extraídas de macro e microalgas, além de cianobactérias (REPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015). As algas, por sua vez, representam uma parte considerável da biomassa oceânica e há muitos anos são utilizadas como alimento e ração devido à sua elevada composição nutricional (MENAA et al., 2020). Atualmente, um grande número de compostos isolados de algas marinhas, como terpenoides, esteróis, fenóis, peptídeos, polissacarídeos e alcanos, tem demonstrado atividades biológicas promissoras (ARRIECHE et al., 2022).

Polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo de moléculas formadas por sequências repetidas de monossacarídeos ligados a sulfatos em posições específicas (JIAO et al., 2011). Essas moléculas fazem parte da matriz extracelular das algas marinhas e atuam, principalmente, no controle hidroeletrolítico destes organismos, contribuindo para sua sobrevivência no oceano (LEE; HO, 2022). Sua importância comercial está centrada na indústria alimentícia, uma vez que os polissacarídeos de algas vermelhas possuem considerável capacidade de formar géis antioxidantes. No entanto, seu potencial farmacoterapêutico é o ponto principal para a grande relevância destas moléculas para as ciências biomédicas. Isso é evidenciado pelos inúmeros efeitos relatados em estudos utilizando polissacarídeos de diferentes espécies de algas, incluindo atividades antiviral (WANG et al., 2017), antitrombótica (CHAGAS et al., 2020), anti-inflamatória (BRITO et al., 2016), antinociceptiva (OLIVEIRA et al., 2020) e antidiarreica (BEZERRA et al., 2018).

Nesta perspectiva, considera-se atualmente que polissacarídeos extraídos de algas marinhas são uma das principais fontes de compostos biologicamente ativos para o desenvolvimento de substâncias de ação terapêutica (HANS; MALIK; NAIK, 2021). As propriedades químicas e atividades biológicas dessas moléculas variam de acordo com sua composição, tamanho molecular e teor de sulfato, o que promove um diversificado espectro de efeitos benéficos (ZHENG et al., 2022). Assim, tais efeitos podem ser encontrados de maneiras distintas entre espécies dos

três tipos de algas (vermelhas, verdes e marrons), sendo indicada uma seleção dos polissacarídeos com os melhores desempenhos para sua futura aplicação.

O gênero *Solieria* pertence à família Solieriaceae (Gigartinales) e é composto por variadas espécies de algas vermelhas que habitam regiões costeiras do oceano Atlântico, principalmente no litoral que compreende o Nordeste do Brasil (CHAVES et al., 2018). Estas algas, e em especial *S. filiformis*, são conhecidas por sintetizar grandes quantidades de carragenina, uma família de galactanos sulfatados lineares importantes por suas propriedades gelificantes (ANA et al., 2021). Ademais, polissacarídeos extraídos de *S. filiformis* apresentaram resultados promissores em diferentes modelos de estudos pré-clínicos, como gastroproteção (SOUSA et al., 2016a), vasodilatação (ASSREUY et al., 2010), atividades antimicrobianas (ANA et al., 2021; PIRES et al., 2013) e analgesia (ARAÚJO et al., 2017).

Embora haja crescentes estudos a respeito do potencial biológico de polissacarídeos isolados de algas marinhas, são poucos os trabalhos que investigam os possíveis efeitos tóxicos destas moléculas. Esta análise é relevante visto que a ocorrência de toxicidade é considerada o principal obstáculo para o desenvolvimento de novas drogas a partir de compostos bioativos (LIN et al., 2003). Portanto, torna-se imprescindível a realização de testes que revelem deficiências funcionais em órgãos ou alterações bioquímicas promovidas por essas substâncias (CHINEDU; AROME; AMEH, 2013). Desse modo, tendo em vista as recentes buscas por novas ferramentas biomédicas para a promoção da saúde, a demonstração da segurança terapêutica do polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* poderia contribuir para futuros estudos clínicos e garantir a integridade dos seus efeitos benéficos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

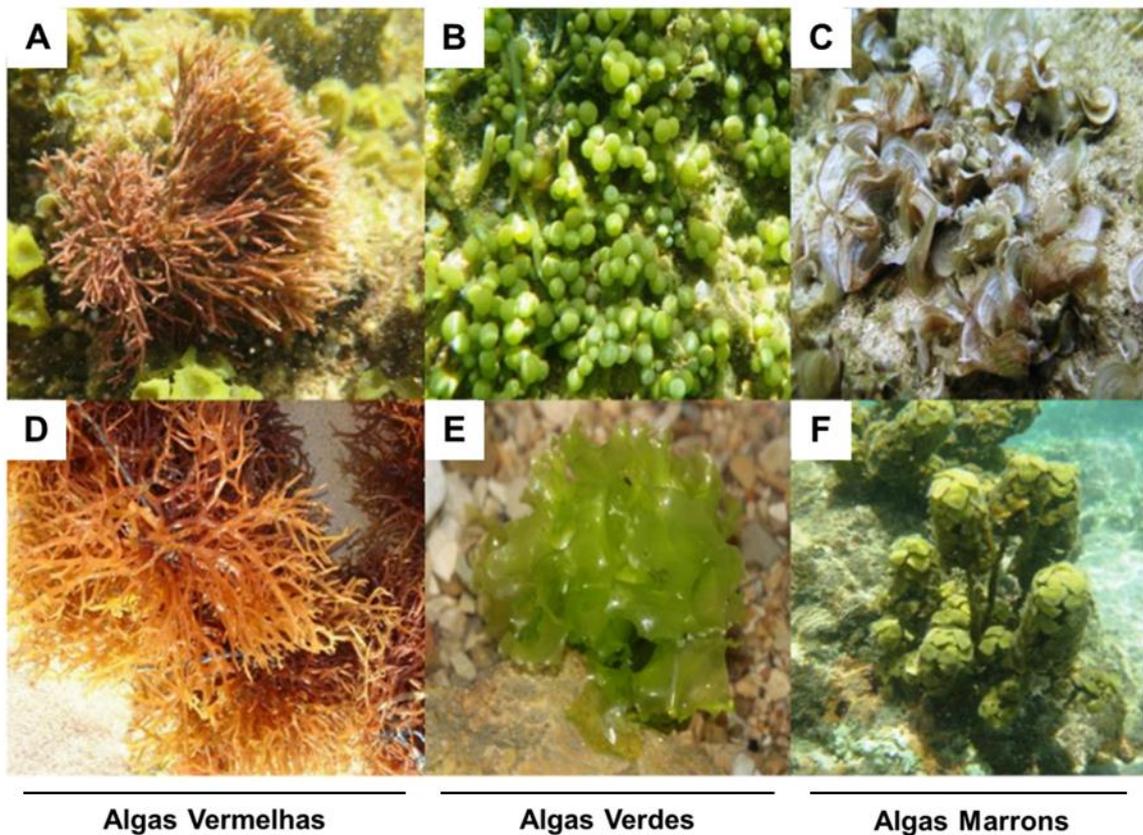
2.1 ALGAS MARINHAS COMO FONTE DE NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS

As algas marinhas são os membros mais antigos do reino vegetal, sendo responsáveis por aproximadamente 50% da fotossíntese que ocorre na Terra a cada ano (QIN; LIN; JIANG, 2012). Estes organismos são amplamente distribuídos ao longo das áreas costeiras em todo o mundo, formando ricas florestas marinhas e tendo sua importância centrada na manutenção da biodiversidade, pois dão suporte às teias alimentares, fornecem habitats e refúgios reprodutivos e atuam como bioindicadores de possíveis mudanças ambientais (TRIBOLLET; SCHILS; VROOM, 2010). Além disso, características de crescimento rápido e sustentabilidade também são marcantes nas algas marinhas, visto que não necessitam de terras aráveis ou fertilizantes para o seu desenvolvimento (XIE; CHEONG, 2022).

Nessa perspectiva, mais de 15.000 espécies de algas são conhecidas globalmente, formando um diversificado grupo de organismos marinhos (KADAM; TIWARI; O'DONNELL, 2013). A classificação atual das algas marinhas leva em consideração sua composição química, especialmente a produção de pigmentos, culminando na formação de três grandes grupos: as algas verdes, as algas marrons e as algas vermelhas (MENAA et al., 2020). A Figura 1 ilustra algumas espécies dos três grupos de algas. Pigmentos como xantofila e fucoxantina são encontrados em algas verdes e marrons, respectivamente, enquanto que ficoeritrina e aloficocianina atribuem características singulares às algas vermelhas (ARYEE, AGYEI, AKANBI, 2018). Outros pigmentos, como a clorofila, são comuns aos três grupos de algas marinhas, diferindo apenas quanto aos seus subtipos.

Entre as algas vermelhas, o gênero *Solieria* se destaca por sintetizar grandes quantidades de carragenina, uma família de galactanos sulfatados (SOUSA et al., 2016a). Pertencente à família Solieriaceae (Gigartinales), este gênero é composto por diferentes espécies de algas vermelhas encontradas em uma longa extensão da costa atlântica brasileira, principalmente no litoral do Nordeste do Brasil (CHAVES et al., 2018). Em particular, *S. filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson possui um potencial valor econômico para as indústrias alimentícia e cosmética, devido principalmente às suas propriedades gelificantes (ANA et al., 2021).

Figura 1. Espécies representativas dos três grupos de algas marinhas.



Fonte: Adaptado de BAYU & HANDAYANI (2018). Imagens ilustrativas de algas marinhas vermelhas, verdes e marrons, com as espécies *Galaxaura rugosa* (A), *Caulerpa racemosa* (B), *Padina australis* (C), *Eucheuma cottonii* (D), *Ulva lactuca* (E) e *Turbinaria decurrens* (F).

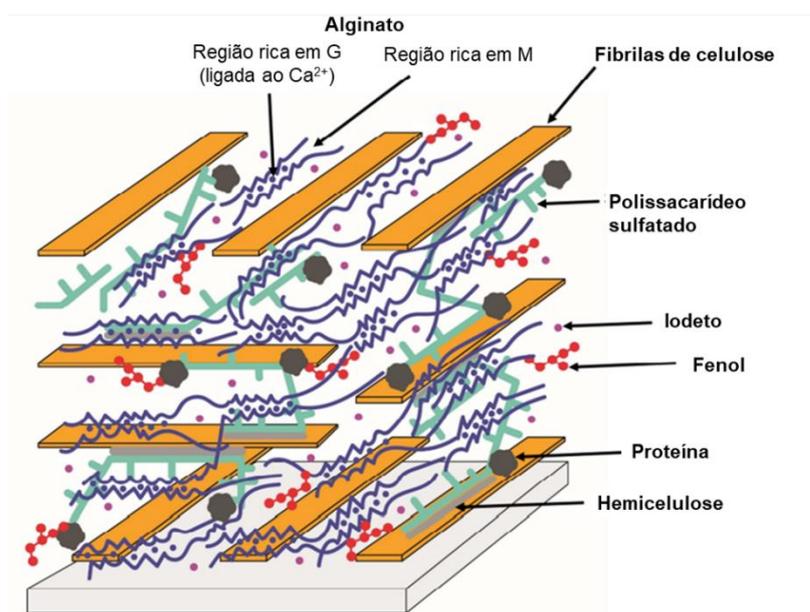
A utilização de algas marinhas em alimentos *in natura* e processados sempre foi amplamente realizada devido à sua elevada composição nutricional, principalmente por populações costeiras (MENAA et al., 2020). A presença abundante de minerais e fibras, e em menor proporção proteínas e lipídeos, desperta há décadas o interesse da indústria alimentícia sobre as algas marinhas como potenciais fontes de alimentação saudável (NORZIAH; CHING, 2000). Nesse sentido, relatórios anteriores também mostraram que *S. filiformis* pode crescer abundantemente sob condições controladas, o que a torna adequada para o cultivo e produção de compostos valiosos para a área nutracêutica (ROBLEDO; GARCÍA-REINA, 1993).

Ademais, atualmente, substâncias extraídas de algas marinhas têm ganhado importância também nas ciências biomédicas, uma vez que apresentam aplicações farmacológicas promissoras como agentes antioxidantes, anti-inflamatórios e

antiproliferativos, além de propriedades de proteção cardiovascular (CHEONG, et al., 2018; RAMOS-ROMERO et al., 2021). Nesse contexto, um número significativo de metabólitos secundários bioativos, incluindo carotenoides, polifenóis, polissacarídeos e esteróis, tem sido relatado a partir de algas marinhas (HANNAN et al., 2020). A singularidade ligada a estes compostos é devido à sua grande diversidade estrutural e funcional, cuja necessidade é atribuída ao ambiente de vida extremo e hostil no qual estes organismos estão inseridos.

Dentre estes, os polissacarídeos compreendem um grupo heterogêneo de moléculas formadas por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, os quais também podem estar ligados a sulfatos, grupos metoxila ou piruvato em posições específicas (JIAO et al., 2011). Estas macromoléculas estão presentes na parede celular ou na matriz extracelular das algas marinhas, permitindo sua sobrevivência no ambiente de alto teor de sal característico da água do mar (Figura 2). Para isso, os polissacarídeos formam uma matriz tipo gel na qual outros componentes importantes da parede celular são incorporados, como fibrilas de celulose, tornando possível sua interação com a água, cátions metálicos e outras moléculas (LEE; HO, 2022). Além disso, os polissacarídeos também atuam reduzindo o movimento de sódio (Na^+) nas células das algas e, assim, contribuem para o controle da diferença de salinidade entre os meios intra e extracelular (DENIAUD-BOUËT et al., 2017).

Figura 2. Modelo de estrutura da parede celular das algas marinhas.

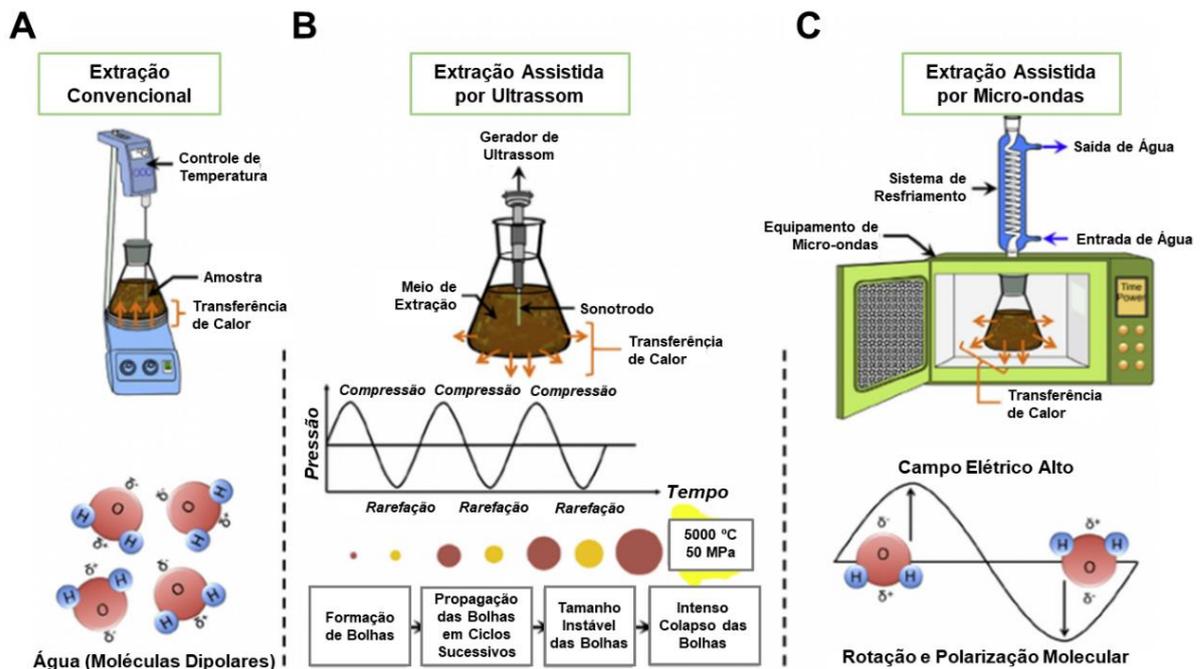


Fonte: Adaptado de CHAROENSIDDHI et al. (2017). Os polissacarídeos sulfatados estão associados às fibrilas de celulose e são incorporados dentro em uma rede de alginato.

2.2 EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS

O primeiro passo para a utilização de polissacarídeos de algas marinhas envolve a extração adequada dessas moléculas. Diferentes métodos de extração têm sido utilizados com esta finalidade (Figura 3), os quais podem variar desde procedimentos convencionais, como a utilização de água quente, até técnicas mais inovadoras, como a extração assistida por ultrassom (UAE) (CARREIRA-CASAI et al., 2021). Em comum, as técnicas de extração visam a separação do polissacarídeo da matriz e a eliminação de substâncias interferentes, que incluem compostos de baixo peso molecular, lipídeos e outros tipos de materiais presentes na amostra (ALVES et al., 2010). Além disso, tais procedimentos são comumente sucedidos por técnicas de purificação, incluindo precipitação com etanol, separação por membrana ou métodos cromatográficos de afinidade, permitindo a obtenção de um produto mais limpo e autêntico (XU; HUANG; CHEONG, 2017).

Figura 3. Técnicas de extração de polissacarídeos de algas marinhas.



Fonte: Adaptado de BARBA et al. (2016). Configuração experimental para extração convencional de moléculas da matriz extracelular (A); princípio da extração assistida por ultrassom e fenômeno de cavitação (B); e equipamento utilizado para extração assistida por micro-ondas, mostrando o mecanismo de rotação molecular (C).

Como relatado na literatura, uma das técnicas mais simples para extrair polissacarídeos consiste na aplicação de água destilada a temperaturas superiores a 60°C (HAHN et al., 2012). Este método clássico atua quebrando os componentes da parede celular das algas e liberando-os no solvente (WASSIE et al., 2021). No entanto, a exigência de altas temperaturas e períodos mais longos para sua realização, bem como sua menor eficiência de extração, são desvantagens importantes evidenciadas neste método, tornando-o menos atrativo atualmente (XU; HUANG; CHEONG, 2017). O uso de ácidos também foi outro meio bastante utilizado para isolar polissacarídeos de algas marinhas, mas que, nos últimos anos, não vem sendo frequentemente empregado (ALE; MIKKELSEN; MEYER, 2011).

Nesta perspectiva, a fim de aumentar a eficiência da extração, novas técnicas têm sido recentemente aplicadas para a obtenção destes polissacarídeos. A extração assistida por micro-ondas (MAE), por exemplo, utiliza energia de micro-ondas para aquecer solventes em contato com a amostra, o que leva à ruptura efetiva da célula (YUAN et al., 2018). Desse modo, a MAE causa a quebra das ligações de hidrogênio e a migração dos íons dissolvidos, contribuindo para a penetração do solvente na matriz e facilitando a extração do polissacarídeo (KADAM; TIWARI; O'DONNELL, 2013). Contudo, embora seja economicamente mais viável que outras técnicas, a MAE não deve ser empregada para extração de bioativos sensíveis ao calor (WANG; WELLER, 2006).

Outro método de extração que emprega a energia de ondas é a UAE. Nesta técnica, a propagação de ondas ultrassônicas por um líquido produz variações de pressão que culminam na formação de bolhas de cavitação (CARREIRA-CASAS et al., 2021). O colapso implosivo dessas bolhas em campos de ultrassom fortes leva à formação de macroturbulências no meio, gerando colisões interpartículas, descamação da superfície e erosão da matriz, o que facilita a liberação de bioativos (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012). Este efeito provocado pela UAE aumenta a eficiência da extração ao passo que reduz o tempo gasto para este processo, não havendo relatos de interferência na estrutura molecular dos polissacarídeos extraídos por este método (TANG et al., 2016).

Por outro lado, a extração assistida por enzimas (EAE) também tem se mostrado uma opção viável e eficiente para a obtenção de polissacarídeos. O princípio da EAE está baseado na degradação enzimática da estrutura da parede celular das algas, liberando para o solvente as moléculas ali presentes

(RODRIGUES et al., 2015). A utilização de enzimas de qualidade alimentar comuns, como celulase, α -amilase e pepsina, tornam este método relativamente barato e não tóxico (WIJESINGHE; JEON, 2012). Além disso, o alto rendimento da EAE já foi confirmado em estudos anteriores, sendo comparado a outras técnicas menos compensativas (CHI et al., 2018). Nesse sentido, considera-se atualmente que a EAE é um dos métodos mais promissores para a extração de polissacarídeos de algas marinhas devido à sua alta eficiência e melhores condições de reação (XU; HUANG; CHEONG, 2017).

2.3 PROPRIEDADES FÍSICAS E ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS

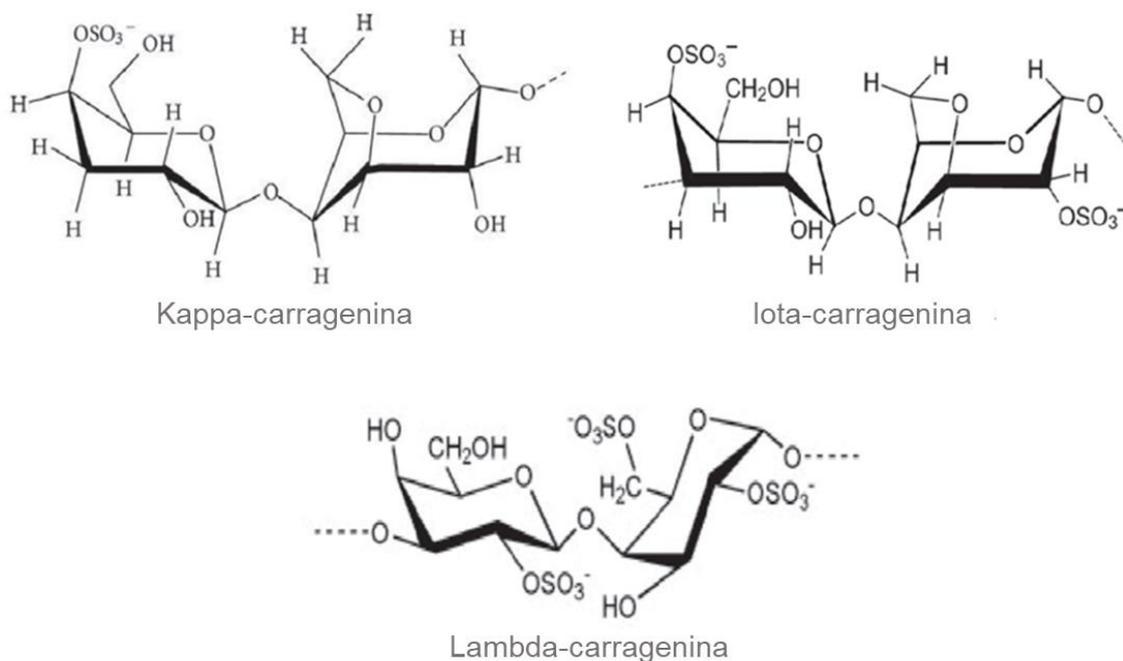
2.3.1 Carrageninas de Algas Vermelhas

Os polissacarídeos conhecidos geralmente como galactanos são o principal componente estrutural das algas vermelhas (Rhodophyta), sendo determinantes para o agrupamento das espécies e suas condições de habitat, além de serem responsáveis por uma ampla gama de atividades biológicas (BESEDNOVA et al., 2020). A presença de grupos reativos abundantes, bem como a versatilidade no peso molecular e na composição química, confere diversidade às propriedades estruturais e funcionais desses biopolímeros (LIU et al., 2008). Desse modo, eles são classificados principalmente como agaranos e carragenanos com base em sua estereoquímica (KNUTSEN et al., 1994).

As carrageninas são uma família de hidrocoloides sulfatados cuja cadeia polimérica é construída a partir de resíduos de galactose e seus derivados, com ligações α e β alternadas (BESEDNOVA et al., 2020). Mais de 15 estruturas diferentes de carrageninas já foram relatadas até os dias atuais, sendo a kappa-, a lambda- e a iota-carragenina as mais relevantes (VÉLIZ et al., 2017). A Figura 4 mostra a composição dos três principais tipos de carragenina. As porções de sulfato presentes em locais específicos de sua estrutura determinam predominantemente a reatividade química das carrageninas (QURESHI et al., 2019). Além disso, o grau de sulfatação destes polissacarídeos também desempenha um papel primordial nos efeitos esperados com sua utilização, o que tem concentrado esforços recentes na pesquisa e introdução de características de sulfato até mesmo em outros tipos de moléculas, como no ácido hialurônico (SILVA et al., 2012a).

Devido à suas propriedades reológicas, carrageninas extraídas de algas marinhas são de grande importância para o setor comercial, uma vez que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia como agentes gelificantes e espessantes (JIAO et al., 2011). Na presença de sais de metais alcalinos monovalentes ou alcalino-terrosos divalentes, como o potássio (K^+) e o cálcio (Ca^{2+}), kappa- e iota-carragenina possuem a capacidade de formar géis (MICHEL; MESTDAGH; AXELOS, 1997). Por outro lado, lambda-carragenina não compartilha da mesma propriedade física, mesmo na presença de cátions metálicos (KIM; KANG, 2020). Apesar das diferenças, suas características estruturais contribuem para a demonstração das várias atividades biológicas desempenhadas por essas moléculas (KHOTIMCHENKO et al., 2020).

Figura 4. Unidade estrutural das principais carrageninas de algas vermelhas.



Fonte: Adaptado de HANS; MALIK & NAIK (2021). Organização conformacional da β-D-galactopirranose e da 3,6-α-galactopirranose que compõem as carrageninas mais relevantes, diferindo entre si quanto ao número e posição dos grupos ésteres de sulfato.

Um estudo desenvolvido por Sousa et al. (2016), utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), revelou que o polissacarídeo de *S. filiformis* é constituído por uma rica estrutura de iota-carragenina, com a presença de uma cadeia principal linear de β-D-galactopirranose-4-sulfato e 3,6-anidro-α-D-galactopirranose-2-sulfato

(SOUSA et al., 2016a). O emprego de técnicas biofísicas continua sendo primordial para a análise do perfil estrutural de polissacarídeos complexos (XU; HUANG; CHEONG, 2017). A FTIR, por exemplo, contribui principalmente para a análise do teor de sulfato nas frações de polissacarídeos (JE et al., 2021; HAO et al., 2019). Já a RMN fornece informações quanto à sequência de unidades dos monossacarídeos, às características de ligação e à presença de açúcares do tipo α ou β (LI et al., 2015). Desse modo, os resultados obtidos por Sousa et al. (2016) evidenciaram a presença de açúcar total em 66% da estrutura do polissacarídeo de *S. filiformis*, apresentando porcentagens em peso de carbono e enxofre de 27,2% e 6,5%, respectivamente, e apenas alguns traços de proteína (SOUSA et al., 2016a).

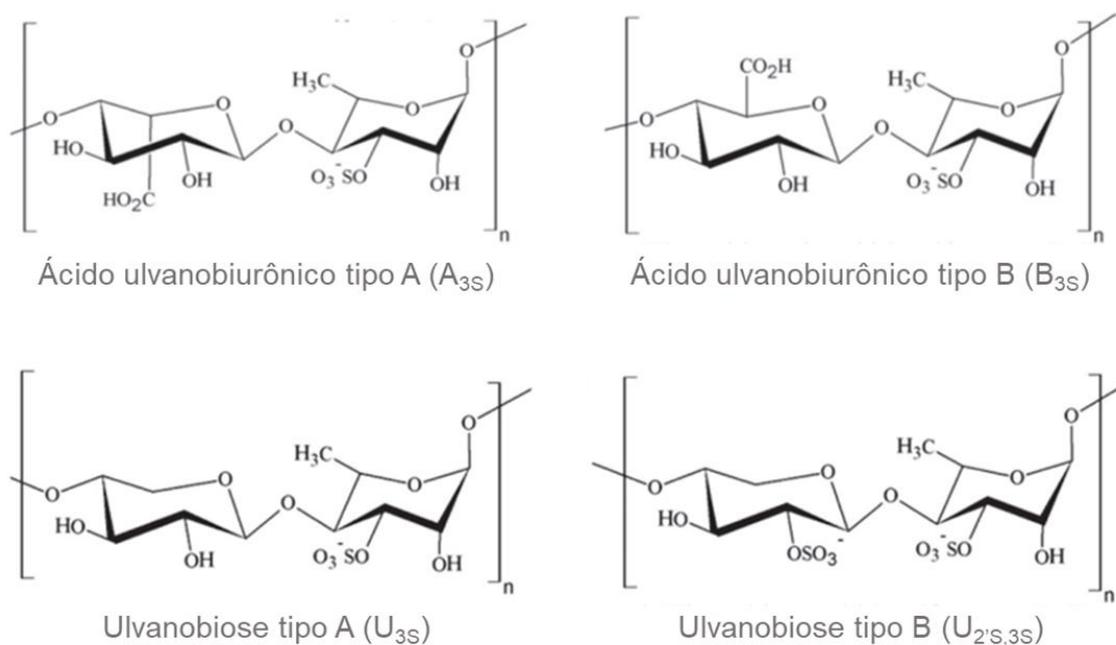
Ademais, utilizando a técnica de cromatografia por exclusão de tamanho de alta eficiência (HPSEC), Sousa et al. (2016) também descreveu que o polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* possuía uma alta massa molar polidispersiva, com uma estimativa de pico em 210,4 kDa (SOUSA et al., 2016a). Segundo a literatura, a HPSEC é geralmente um dos métodos mais indicados para a determinação do peso molecular de polissacarídeos, uma vez que a técnica se baseia propriamente no tamanho molecular como princípio básico (XU; HUANG; CHEONG, 2017). Assim, a evidência de valores elevados de peso molecular é comum e já foi relatado em polissacarídeos de outras algas marinhas (POMIN, 2010; BARROS et al., 2013). Tendo em vista a crescente demanda por polissacarídeos de algas marinhas, cabe ressaltar que a busca por métodos mais convenientes será permanente.

2.3.2 Polissacarídeos de Outros Tipos de Algas

Nos últimos anos, as algas verdes (Chlorophyta) também têm sido amplamente usadas como materiais naturais para extração de substâncias bioativas (WANG et al., 2014). Dessa forma, os ulvanos são o principal polissacarídeo solúvel encontrado neste tipo de algas (JIAO et al., 2011). Sua estrutura química foi pré-estabelecida ainda nos anos 1950, em um trabalho pioneiro de Brading et al. (1954), demonstrando que sulfato, ramnose, xilose e ácido glicurônico são os principais constituintes dos ulvanos (BRADING; GEORG-PLANT; HARDY, 1954) (Figura 5). Mais tarde, também foi demonstrada a capacidade destas moléculas de formarem géis, assim como nas algas vermelhas, desde que em condições ótimas de pH e na presença de cátions bivalentes (LAHAYE; ROBIC, 2007).

Além disso, as propriedades físico-químicas dos ulvanos, como estabilidade térmica e versatilidade, tornam-nos polímeros promissores para utilização em diversas áreas, desde a saúde até aplicações industriais (ALVES et al., 2010). No entanto, apesar da abundância e disponibilidade de algas verdes, diferenças significativas quanto ao seu arranjo molecular podem dificultar o estudo de suas bioatividades (TABARSA et al., 2012). Essa variabilidade é evidenciada no tipo de carga e composição de açúcares de sua estrutura, influenciando diretamente nos diferentes pesos moleculares e viscosidade intrínseca dos ulvanos (REVIERS; LEPROUX, 1993). Por sua vez, algumas algas verdes, particularmente do gênero *Codium*, também podem ser fontes importantes de galactanos sulfatados, embora a sua fonte mais comum sejam as algas vermelhas (MATSUBARA et al., 2003).

Figura 5. Principais dissacarídeos encontrados nos ulvanos de algas verdes.



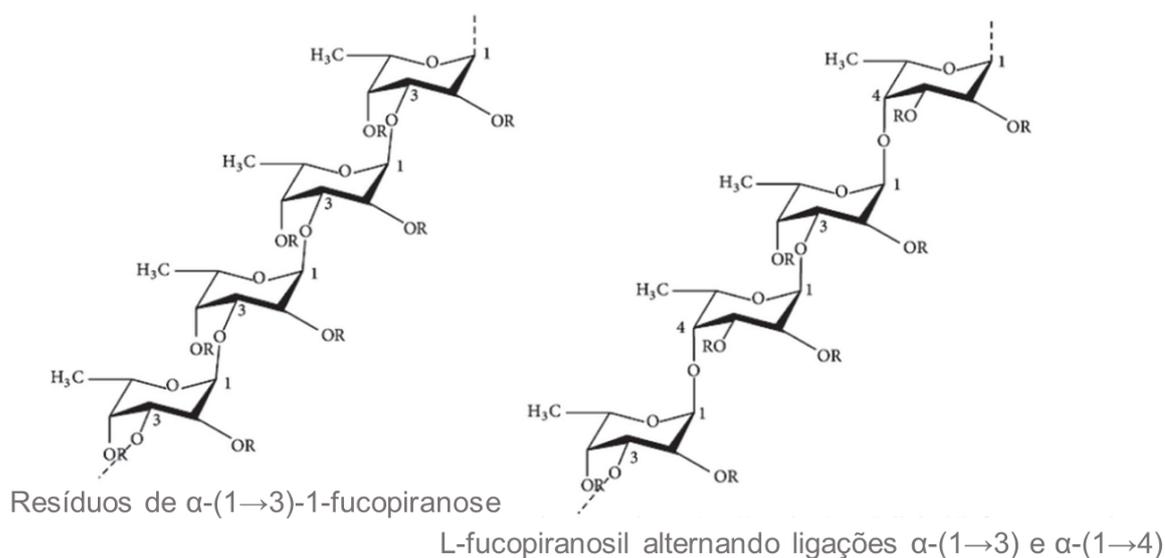
Fonte: Adaptado de HANS; MALIK & NAIK (2021). Estrutura geral do ácido ulvanobiurônico tipo A (composto por ramnose + ácido glicurônico) e tipo B (ramnose + ácido idurônico), e das ulvanobioses (xilose + ramnose), diferindo entre si quanto ao número e posição dos grupos ésteres de sulfato.

À semelhança dos ulvanos para as algas verdes, os fucanos são os polissacarídeos sulfatados mais encontrados nas algas marrons (Phaeophyta), incluindo o fucoidan (JIAO et al., 2011). Estes compostos se caracterizam por ser moléculas regulares formadas por unidades repetidas de dissacarídeos com uma cadeia principal linear de resíduos de α -fucose ligados à grupos sulfatos

(MENSHOVA et al., 2016), como apresentado na Figura 6. Devido ao grande número de espécies e biomassa, os fucanos sulfatados de algas marrons estão entre os polissacarídeos marinhos mais abundantes na natureza, promovendo uma ampla e rica fonte de bioativos (POMIN; MOURÃO, 2008).

A aplicação potencial dos fucanos na tecnologia farmacêutica também se deve à sua natureza iônica (BESEDNOVA et al., 2020). A carga negativa destas moléculas resulta da presença de resíduos de sulfato em posições estratégicas, permitindo a formação de complexos com outras moléculas de carga oposta (CITKOWSKA; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019). Dessa forma, o fucoidan tem sido objeto de muitos estudos recentemente, a fim de se avaliar seus potenciais efeitos biológicos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ALE; MIKKELSEN; MEYER, 2011). Em contrapartida, a heterogeneidade de sua estrutura pode ser um fator limitante para a utilização destes polissacarídeos, uma vez que diferentes condições de extração são capazes de dar origem a formas distintas de fucanos, até mesmo dentro da mesma espécie (JIAO et al., 2011).

Figura 6. Arranjo em cadeia dos monossacarídeos de fucanos de algas marrons.



Fonte: Adaptado de HANS; MALIK & NAIK (2021). Cadeia principal do fucoidan, apresentando resíduos de fucopiranosose ligados entre si por ligações α -(1 \rightarrow 3) repetidas ou por ligações α -(1 \rightarrow 3) alternadas por ligações α -(1 \rightarrow 4), com presença heterogênea de grupos ésteres de sulfato.

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

2.4.1 Proteção do Trato Gastrointestinal

Os trabalhos que abordam a utilização de polissacarídeos sulfatados para a prevenção e tratamento de desordens digestivas são inúmeros (Tabela 1). Assim, algas marinhas das mais variadas espécies já demonstraram importantes efeitos gastroprotetores em diferentes modelos pré-clínicos, como na lesão gástrica por etanol. Pereira Júnior et al. (2021), em um estudo utilizando *Acanthophora spicifera*, revelaram que o polissacarídeo extraído dessa alga vermelha era capaz de proteger a mucosa do estômago a partir da prevenção de alterações na microvasculatura local e na barreira de muco (PEREIRA JÚNIOR et al., 2021). Efeitos como estes têm sido relacionados à atuação de mediadores produzidos endogenamente, como prostaglandinas (PGs) e óxido nítrico (NO), cuja ação possui papel central na atividade gastroprotetora de polissacarídeos obtidos de *Caulerpa mexicana* (CARNEIRO et al., 2018) e *Hypnea musciformis* (DAMASCENO et al., 2013).

Em comum, estes autores ainda concluíram que um dos mecanismos de gastroproteção mais promissores dos polissacarídeos sulfatados é a redução do estresse oxidativo. De fato, a peroxidação lipídica é um dos fatores primordiais para o desenvolvimento de lesão gástrica a partir do consumo de etanol devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BHATTACHARYYA et al., 2014). Nesse sentido, *S. filiformis* se destaca por possuir uma marcante ação antioxidante contra a formação de EROs, apresentando alta habilidade de quelação e sequestro desses radicais (SOUSA et al., 2016a). Ademais, o polissacarídeo desta alga marinha preveniu o consumo de glutathiona (GSH) e o aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica lesionada, o que reforça seu efeito protetor contra a lipoperoxidação.

Além da lesão por etanol, polissacarídeos sulfatados também já apresentaram efeitos promissores em outros modelos de lesão gástrica. Anti-inflamatórios não esteroides (AINES) também são utilizados devido à sua capacidade de causar danos ao trato gastrointestinal (TGI), como erosão, ulceração e hemorragia (FRIES et al., 1991). Desse modo, utilizando ácido acetilsalicílico (AAS), Hu et al. (2020) mostraram que um fucoidan extraído de *Kjellmaniella crassifolia* foi capaz de suprimir a ativação da via NF- κ B e a liberação de citocinas, protegendo, assim, a

mucosa gástrica contra seus efeitos lesivos (HU et al., 2020). De maneira similar, um polissacarídeo de *Gracilaria birdie* demonstrou um importante efeito sobre a migração de neutrófilos para a mucosa gástrica, atenuando a inflamação local e a formação de EROs num modelo de lesão por naproxeno (SILVA et al., 2012b).

Tabela 1. Efeitos dos polissacarídeos de algas marinhas em modelos de desordens digestivas.

Espécie	Modelo de Doença	Principais Achados	Referência
Algas Vermelhas			
<i>Acanthophora spicifera</i>	Lesão Gástrica por Etanol	↓ Peroxidação Lipídica ↓ Ruptura da Camada de Muco	PEREIRA JÚNIOR et al. (2021)
<i>Gracilaria birdie</i>	Colite por TNBS	↓ Migração de Neutrófilos ↓ Liberação de Citocinas ↓ Peroxidação Lipídica	BRITO et al. (2014)
	Lesão Gástrica por Naproxeno	↓ Migração de Neutrófilos ↓ Peroxidação Lipídica	SILVA et al. (2012b)
<i>Gracilaria caudata</i>	Diarreia por Óleo de Rícino	↓ Motilidade Intestinal	COSTA et al. (2016)
<i>Gracilaria cervicornis</i>	Diarreia por Óleo de Rícino	↑ Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	BEZERRA et al. (2018)
<i>Hypnea musciformis</i>	Colite por TNBS	↓ Migração de Neutrófilos ↓ Liberação de Citocinas ↓ Peroxidação Lipídica	BRITO et al. (2016)
	Diarreia por Óleo de Rícino	↑ Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase ↓ Motilidade Intestinal	SOUSA et al. (2016b)
	Lesão Gástrica por Etanol	↓ Peroxidação Lipídica ↑ Atividade da via NO/K _{ATP}	DAMASCENO et al. (2013)
<i>Solieria filiformis</i>	Lesão Gástrica por Etanol	↓ Peroxidação Lipídica ↑ Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	SOUSA et al. (2016a)
Algas Verdes			
<i>Caulerpa mexicana</i>	Lesão Gástrica por Etanol	↑ Defesa da Mucosa ↓ Peroxidação Lipídica	CARNEIRO et al. (2018)
Algas Marrons			
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	Lesão Gástrica por AAS	↓ Atividade da via NF-κB ↓ Liberação de Citocinas ↓ Peroxidação Lipídica	HU et al. (2020)

Legenda: Aumento, ↑; Diminuição, ↓.
Fonte: Autor (2023).

O gênero *Gracilaria* também se destaca por seus efeitos antidiarreicos. Bezerra et al. (2018) mostraram que *G. cervicornis* atuava eficientemente contra a diarreia provocada por óleo de Rícino em camundongos (BEZERRA et al., 2018). Para isso, eles descobriram que o seu polissacarídeo restaurou a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e reestabeleceu o gradiente iônico ideal para o transporte de água no intestino, evitando assim o acúmulo de fluido luminal. Utilizando o mesmo modelo pré-clínico, Costa et al. (2016) constataram que um polissacarídeo de *G. caudata* possuía um efeito anticolinérgico sobre a musculatura lisa do intestino, reduzindo o trânsito intestinal e a progressão da diarreia (COSTA et al., 2016). Curiosamente, um polissacarídeo de *H. musciformis* foi capaz de apresentar ambos os efeitos relatados, o que o torna promissor para o desenvolvimento de novos agentes de valor medicinal para doenças diarreicas (SOUSA et al., 2016b).

Por outro lado, a doença inflamatória intestinal (DII) também é de grande preocupação mundial. Na DII, há um aumento no número de células inflamatórias em áreas do intestino, principalmente no cólon, tornando-se um problema de saúde crônico (FIOCCHI, 1998). Nesta perspectiva, um efeito anti-inflamatório significativo foi evidenciado em carrageninas extraídas de *G. birdie* (BRITO et al., 2014) e *H. musciformis* (BRITO et al., 2016), utilizando um modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS). Os resultados destes estudos mostraram que o infiltrado polimorfonuclear foi consideravelmente reduzido pela administração dos polissacarídeos, interferindo, direta ou indiretamente, na produção e liberação de citocinas e na peroxidação lipídica da mucosa colônica.

2.4.2 Regulação do Sistema Cardiovascular e da Hemostasia

Assim como o TGI, o sistema cardiovascular também vem sendo bastante beneficiado pelos polissacarídeos sulfatados (Tabela 2). Grande parte dos estudos envolvendo vasos sanguíneos são relacionados às atividades anticoagulantes e antitrombóticas dessas macromoléculas. Nessa perspectiva, resultados obtidos a partir de algas verdes do gênero *Codium* mostraram que o uso de galactanos sulfatados extraídos de *C. bernabei* (FIGUEROA et al., 2022) e *C. divaricatum* (LI et al., 2015) era capaz de aumentar o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e, assim, interferir no processo de coagulação. Isso sugere uma potencial influência desses compostos sobre componentes da via intrínseca, que incluem os fatores VIII,

IX, XI e XII (ZHOU et al., 2009). Além disso, o polissacarídeo desta última espécie também alterou o tempo de trombina (TT), indicando atuação sobre a etapa final de conversão do fibrinogênio em fibrina.

Tabela 2. Atuação dos polissacarídeos de algas marinhas sobre a homeostasia cardiovascular.

Espécie	Atividade Demonstrada	Principais Achados	Referência
Algas Vermelhas			
<i>Gelidiella acerosa</i>	Anticoagulante	↑ TTPa	CHAGAS et al. (2020)
	Antitrombótica	↓ Formação de Trombos	
	Anticoagulante	↑ TTPa	QUEIROZ et al. (2014)
	Antitrombótica	↑ Atividade Inibitória de AT-III	
		↓ Formação de Trombos	
<i>Solieria filiformis</i>	Vasodilatadora	↑ Relaxamento do Músculo Liso	ASSREUY et al. (2010)
	Anticoagulante	↑ TTPa	
Algas Verdes			
<i>Codium bernabei</i>	Anticoagulante	↑ TTPa	FIGUEROA et al. (2022)
<i>Codium divaricatum</i>	Anticoagulante	↑ TTPa e TT	LI et al. (2015)
<i>Monostroma nitidum</i>	Anticoagulante	↑ TTPa e TT	CAO et al. (2019)
	Antitrombótica	↑ Atividade de AT-III e HC-II	
	Fibrinolítica	↓ Formação de Trombos	
		↑ Degradação de Coágulos	
		↓ Atividade Inibitória de PAI-1	
Algas Marrons			
<i>Laminaria japonica</i>	Antioxidante	↓ Apoptose de Cardiomiócitos	YU et al. (2014)
	Cardioprotetora	↓ Peroxidação Lipídica	
		↓ Superexpressão de PKC	
<i>Padina tetrastromatica</i>	Antioxidante	↑ Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	LEKSHMI; RAUF; KURUP (2019)
	Cardioprotetora	↓ Peroxidação Lipídica	
		↑ Atividade da via PI3K/Akt/Nrf2	

Legenda: Aumento, ↑; Diminuição, ↓.
Fonte: Autor (2023).

A fim de investigar o possível mecanismo subjacente a estes efeitos, Cao et al. (2019) utilizaram dois inibidores naturais da coagulação, a antitrombina III (AT-III) e o cofator II da heparina (HC-II) (CAO et al., 2019). Eles descobriram que o polissacarídeo de *Monostroma nitidum* estimulava a atividade dessas moléculas,

visto que seu efeito anticoagulante foi potencializado quando combinado com AT-III e HC-II à medida que foi significativamente reprimido na sua ausência. Resultados semelhantes foram evidenciados com um polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Gelidiella acerosa*, que também parece atuar por meio da ação inibitória da AT-III para promover parte de seus efeitos benéficos (QUEIROZ et al., 2014; CHAGAS et al., 2020). De maneira complementar, *M. nitidum* ainda demonstrou uma importante atividade fibrinolítica, uma vez que foi capaz de reduzir a atuação do inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e, dessa forma, permitir a degradação de coágulos de fibrina por meio da ação da plasmina (CAO et al., 2019).

Embora também apresente um promissor efeito anticoagulante, a atividade do polissacarídeo de *S. filiformis* sobre o músculo liso vascular é o verdadeiro ponto chave para sua relevância. Assreuy et al. (2010) demonstraram que este galactano promoveu um relaxamento significativo da aorta de ratos, sendo um efeito dependente de fatores produzidos pelas células endoteliais adjacentes (ASSREUY et al., 2010). Essa dependência sobre o endotélio para eventos vasculares também já foi relatada em lectinas extraídas de algas marinhas e reflete a grande influência destas células para a manutenção da homeostase (LIMA et al., 2004). No entanto, cabe salientar que o polissacarídeo de *S. filiformis* não alterou o tônus vascular basal nem a resposta reflexa do músculo liso a agentes contráteis, que são características importantes para compostos com propriedades anti-hipertensivas.

Ademais, efeitos cardioprotetores também foram encontrados em estudos com polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marrons. *Padina tetrastromatica* apresentou uma atividade antioxidante relevante, *in vitro* e *in vivo*, num modelo de lesão cardíaca induzida por isoproterenol (LEKSHMI; RAUF; KURUP, 2019). Neste estudo, o polissacarídeo foi capaz de aumentar a translocação nuclear do Nrf2, um fator de transcrição chave para a regulação dos mecanismos de defesa antioxidante (TEBAY et al., 2015). Dessa forma, a ação de enzimas, incluindo GSH, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), foi fortemente estimulada, prevenindo as células cardíacas dos efeitos da peroxidação lipídica. Resultados semelhantes foram evidenciados utilizando um fucoidan de *Laminaria japonica*, o qual possui um efeito inerente à proteína quinase C (PKC) para inibir o estresse oxidativo e a apoptose em animais com cardiomiopatia diabética (YU et al., 2014).

2.4.3 Combate a Doenças Infecciosas

É imensa a variedade dos efeitos produzidos por polissacarídeos sulfatados contra patógenos de grande importância médica (Tabela 3). Há décadas, os dois principais sorotipos do herpes-vírus simples (HSV-1 e HSV-2) têm sido alvos de estudos científicos promissores, como o realizado por Ohta et al. (2009), cujos resultados mostraram que o polissacarídeo de *C. fragile* possuía uma interessante atividade virucida contra o HSV-2 (OHTA et al., 2009). Além disso, também foi demonstrado que esse galactano sulfatado inibia a adsorção e a penetração do vírus na célula hospedeira, tornando seu efeito antiviral ainda mais relevante. De maneira similar, Talarico et al. (2004), utilizando um polissacarídeo de *Cryptonemia crenulata*, também descobriu um potente efeito contra a etapa de adsorção do vírus, sendo eficazmente protetor para HSV-1 e HSV-2 (TALARICO et al., 2004).

Alterações do metabolismo celular induzidas por vírus, como o HSV, podem causar uma superprodução intracitoplasmática de EROs e provocar danos a diferentes biomoléculas (BRIEGER et al., 2012). Assim, um polissacarídeo extraído de *S. filiformis* foi capaz de reduzir a atividade viral *in vitro* do HSV-1 ao mesmo tempo que mostrou um importante efeito antioxidante, tornando-se resultados ainda mais promissores se tomados em conjunto (ANA et al., 2021). Por outro lado, Hayashi et al. (2008) demonstraram um interessante papel imunológico do fucoidan de *Undaria pinnatifida* contra a infecção por HSV-1 (HAYASHI et al., 2008). Eles relataram um aumento significativo das funções antimicrobianas de macrófagos e linfócitos T e B, bem como estimulou a produção de anticorpos neutralizantes, contribuindo para a supressão da progressão das lesões herpéticas.

Ademais, polissacarídeos de outras algas marrons mostraram ser eficazes contra a infecção por outros tipos de vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da dengue (DENV). *Sargassum swartzii* teve um efeito restritivo sobre a produção de p24, um antígeno da zona central do HIV, simbolizando uma menor atividade viral (DINESH et al., 2016). Também foi evidenciada uma redução na atividade da transcriptase reversa (RT), enzima responsável por produzir a molécula de DNA para a replicação de vírus com genoma de RNA. Por sua vez, Hidari et al. (2008) constataram que o fucoidan de *Cladosiphon okamuranus* conseguia interagir molecularmente com o DENV-2 e, dessa forma, impedir sua ligação à célula hospedeira (HIDARI et al., 2008). Estes

achados servem de estímulo para a busca por novas alternativas para o tratamento de doenças virais ainda preocupantes para a saúde pública no Brasil.

Tabela 3. Atividades antimicrobianas de polissacarídeos de algas marinhas.

Espécie	Patógeno	Principais Achados	Referência
Algas Vermelhas			
<i>Cryptonemia crenulata</i>	HSV-1/HSV-2	↓ Adsorção do Vírus à Célula	TALARICO et al. (2004)
<i>Gracilaria verrucosa</i>	ETEC	• Destruição da Membrana ↓ Adesão da Bactéria à Célula	LIU et al. (2019)
<i>Solieria filiformis</i>	HSV-1	↓ Atividade Viral ↑ Defesas Antioxidantes	ANA et al. (2021)
	<i>Leishmania amazonensis</i>	• Alta Atividade Parasiticida ↓ Taxa de Crescimento	PIRES et al. (2013)
Algas Verdes			
<i>Caulerpa lentillifera</i>	SARS-CoV-2	• Neutralização do Vírus ↓ Infectividade	YOU et al. (2022)
	<i>Helicobacter pylori</i>	↓ Adesão da Bactéria à Célula ↓ Transcrição de NF-κB e IL-8	LE et al. (2022)
<i>Codium fragile</i>	HSV-2	• Atividade Virucida ↓ Adsorção e Penetração do Vírus	OHTA et al. (2009)
<i>Monostroma nitidum</i>	Vírus da Influenza A	↓ Adsorção e Penetração do Vírus • Inibição da Replicação Viral	TERASAWA et al. (2020)
Algas Marrons			
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	DENV-2	• Interação com o DENV-2 • Inibição da Ligação do DENV-2	HIDARI et al. (2008)
<i>Fucus vesiculosus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	↓ Adesão da Bactéria à Célula	PARK et al. (2021)
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	Vírus da Influenza A	↓ Atividade da Neuraminidase ↓ Ativação do EGFR	WANG et al. (2017)
<i>Sargassum swartzii</i>	HIV-1	↓ Produção do Antígeno p24 ↓ Atividade da RT	DINESH et al. (2016)
<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	↓ Parasitemia ↓ Adesão do Parasita à Célula	CHEN et al. (2009)
	HSV-1	↑ Atividade dos Macrófagos ↑ Formação de Linfócitos T e B	HAYASHI et al. (2008)

Legenda: Aumento, ↑; Diminuição, ↓.
Fonte: Autor (2023).

Alguns vírus respiratórios também são alvos dos polissacarídeos, como é o caso do vírus da influenza A. Sua infectividade já foi fortemente suprimida por *M. nitidum*, impedindo sua adsorção e penetração na célula (TERASAWA et al., 2020). Além disso, Wang et al. (2017) demonstraram que o polissacarídeo de *K. crassifolia* impedia a ação normal da neuraminidase e, assim, bloqueava a saída do vírus da célula após sua replicação (WANG et al., 2017). Outro resultado obtido no estudo revelou também que o fucoidan desta alga marinha era capaz de interferir na ligação do vírus da influenza A com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), promovendo uma redução da internalização do vírus na célula. Cabe ressaltar, ademais, a importante atividade neutralizante do polissacarídeo de *C. lentillifera* sobre o SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19, visto que atualmente este é um assunto de interesse global após a expansão mundial da doença (YOU et al., 2022).

De maneira complementar, o polissacarídeo desta alga verde também apresentou um relevante efeito antibacteriano contra *Helicobacter pylori* (LE et al., 2022). Os autores descreveram que, ao suprimir a transcrição de genes ligados à expressão de NF- κ B e IL-8, *C. lentillifera* impedia o crescimento das colônias e a adesão da *H. pylori* às células da mucosa gástrica. Resultados semelhantes foram obtidos por Park et al. (2021) e Liu et al. (2019), que demonstraram propriedades antiadesivas de polissacarídeos de *Fucus vesiculosus* (PARK et al., 2021) e *G. verrucosa* (LIU et al., 2019) sobre a infecção dérmica por *Staphylococcus aureus* e a diarreia provocada por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), respectivamente.

Ações antiparasitárias também merecem destaque quando o assunto são as atividades biológicas dos polissacarídeos de algas marinhas, com ênfase para o galactano sulfatado de *S. filiformis*. Sua relevância foi constatada em um estudo de Pires et al. (2013), no qual demonstraram que o polissacarídeo desta alga vermelha, dentre outras espécies, é o mais eficaz para combater a infecção por *Leishmania amazonensis* (PIRES et al., 2013). Os achados relatados por eles reafirmam o potencial farmacoterapêutico exercido por estas macromoléculas e contribuem para o descobrimento de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose. Ademais, o fucoidan extraído de *U. pinnatifida* conseguiu atenuar a presença de *Plasmodium falciparum* na corrente sanguínea e sua adesão aos eritrócitos, sendo um resultado importante para agentes antimaláricos promissores (CHEN et al., 2009).

2.4.4 Alívio da Dor Neuropática e Inflamatória

Em adição às inúmeras atividades biológicas relatadas até agora, a literatura descreve importantes efeitos antinociceptivos desempenhados por macromoléculas extraídas de algas marinhas (Tabela 4). Nesse sentido, um estudo de Araújo et al. (2017) chama atenção por seu valor terapêutico e seu pioneirismo, visto que foi demonstrado o envolvimento do sistema nervoso central (SNC) nos resultados obtidos com o polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* (ARAÚJO et al., 2017). As evidências sugerem que a atuação desta carragenina é mediada pela ativação de diferentes receptores opioides presentes no SNC, promovendo um alívio eficaz da dor semelhante ao da morfina em ratos. De fato, os receptores opioides são de longe os alvos da maioria dos medicamentos aprovados e comercializados para o controle da dor devido à sua capacidade de impactar seletivamente os estímulos nociceptivos sem prejudicar outras sensações (SHANG; FILIZOLA, 2015).

Assim, os opioides agem por meio da ativação de um sistema modulador da dor que compreende peptídeos endógenos, como encefalinas, dinorfinas e β -endorfina, e seus receptores (PASTERNAK, 2014). Sabe-se atualmente que o fenômeno da dor é acompanhado por uma capacidade reduzida de recrutamento dessas moléculas endógenas, o que dificulta o seu controle e eliminação (TASHIRO; OKAMOTO; BEREITER, 2008). Curiosamente, o polissacarídeo de *S. filiformis* também promoveu o aumento dos níveis endógenos de β -endorfina, demonstrando um papel valioso na modulação da dor (ARAÚJO et al., 2017). Além disso, não foram visualizados efeitos colaterais comumente observados no uso de opioides, como vômitos, constipação ou depressão respiratória, o que reforça a importância dessa molécula na busca por novas substâncias com ação analgésica.

Diversos outros estudos abordam atividades de polissacarídeos sulfatados sobre a inervação localizada nos tecidos periféricos, principalmente relacionadas a um efeito anti-inflamatório local. A dor inflamatória é considerada a segunda fase da dor em diferentes doenças crônicas e é desencadeada por uma combinação de estímulos, incluindo a infiltração celular e a liberação de mediadores inflamatórios, que sensibilizam as terminações nervosas adjacentes (CHEN; DONNELLY; JI, 2020). Desse modo, polissacarídeos extraídos de *Agardhiella ramosissima* (BATISTA et al., 2014) e *G. caudata* (OLIVEIRA et al. 2020) foram eficazes no controle da dor inflamatória por reduzir a formação de edema e a migração de

neutrófilos para a região afetada. Resultados semelhantes foram observados pelo galactano da alga vermelha *G. intermedia*, que também suprimiu a liberação de IL-1 β e a estimulação dos nervos periféricos (COSTA et al., 2020).

Tabela 4. Ação antinociceptiva de polissacarídeos extraídos de algas marinhas.

Espécie	Local de Ação	Principais Achados	Referência
Algas Vermelhas			
<i>Acanthophora muscoides</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor Inflamatória ↓ Liberação de Histamina	QUINDERÉ et al. (2013)
<i>Agardhiella ramosissima</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor Inflamatória ↓ Migração de Neutrófilos	BATISTA et al. (2014)
<i>Gelidium crinale</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor Inflamatória ↓ Liberação de Histamina	SOUSA et al. (2013)
<i>Gracilaria caudata</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor Inflamatória ↓ Migração de Neutrófilos	OLIVEIRA et al. (2020)
<i>Gracilaria intermedia</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor Inflamatória ↓ Migração de Neutrófilos ↓ Liberação de IL-1 β	COSTA et al. (2020)
<i>Hypnea pseudomusciformis</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor Inflamatória • Inibição dos TRPs ↓ Liberação de Glutamato	SOUZA et al. (2019)
<i>Solieria filiformis</i>	SNC	↓ Dor (via Sistema Opióide) • Ativação de Receptores Centrais ↑ Níveis de β -Endorfina	ARAÚJO et al. (2017)
Algas Verdes			
<i>Caulerpa mexicana</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor Inflamatória ↓ Migração de Neutrófilos ↓ Liberação de Histamina	CARNEIRO et al. (2014)
<i>Caulerpa racemosa</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor inflamatória ↓ Liberação de TNF- α e IL-1 β ↑ Atividade da HO-1	RIBEIRO et al. (2020)
<i>Ulva lactuca</i>	Nervos Periféricos	↓ Dor Inflamatória ↓ Liberação de TNF- α e IL-1 β ↑ Atividade da HO-1	ARAÚJO et al. (2016)

Legenda: Aumento, ↑; Diminuição, ↓.
Fonte: Autor (2023).

Esta ação desempenhada por citocinas pró-inflamatórias é crucial para o desenvolvimento de hipernocicepção (KRUSTEV; RIOUX; MCDUGALL, 2015). Como evidenciado por Ribeiro et al. (2020) e Araújo et al. (2016), polissacarídeos das algas verdes *C. racemosa* e *Ulva lactuca* atenuaram a ação de TNF- α e IL-1 β

sobre os nervos sensitivos dos animais, além de promoverem um relevante aumento da atividade endógena da heme oxigenase-1 (HO-1), uma enzima induzível envolvida na regulação fisiológica em condições de estresse, como na inflamação (RIBEIRO et al., 2020; ARAÚJO et al., 2016). Por outro lado, *C. mexicana* parece atuar de maneira inibitória sobre a liberação de histamina para promover seus efeitos antinociceptivos (CARNEIRO et al., 2014), achados que também são compartilhados por estudos anteriores com polissacarídeos de outras espécies (QUINDERÉ et al., 2013; SOUSA et al., 2013).

Apesar de agir sobre os nervos periféricos, *H. pseudomusciformis* demonstrou um potente efeito inibitório do sistema glutamatérgico (SOUZA et al., 2019). Para isso, foi revelado que o polissacarídeo dessa alga vermelha bloqueava canais do tipo receptores de potencial transitório (TRPs) e, dessa forma, conseguia modular a liberação de glutamato. A relação entre TRPs e a via glutamatérgica já vem sendo estudada e sugere-se que a liberação de peptídeos neuroativos mediada por TRPs é crucial para o processamento da dor (MEDVEDEVA; KIM; USACHEV, 2008). Assim, considerando que o glutamato possui uma alta capacidade excitatória nos neurônios terminais e que está diretamente envolvido na transmissão dolorosa, mecanismos que envolvam sua regulação, como o demonstrado por SOUZA et al. (2019) podem ser promissores para futuros estudos utilizando algas marinhas.

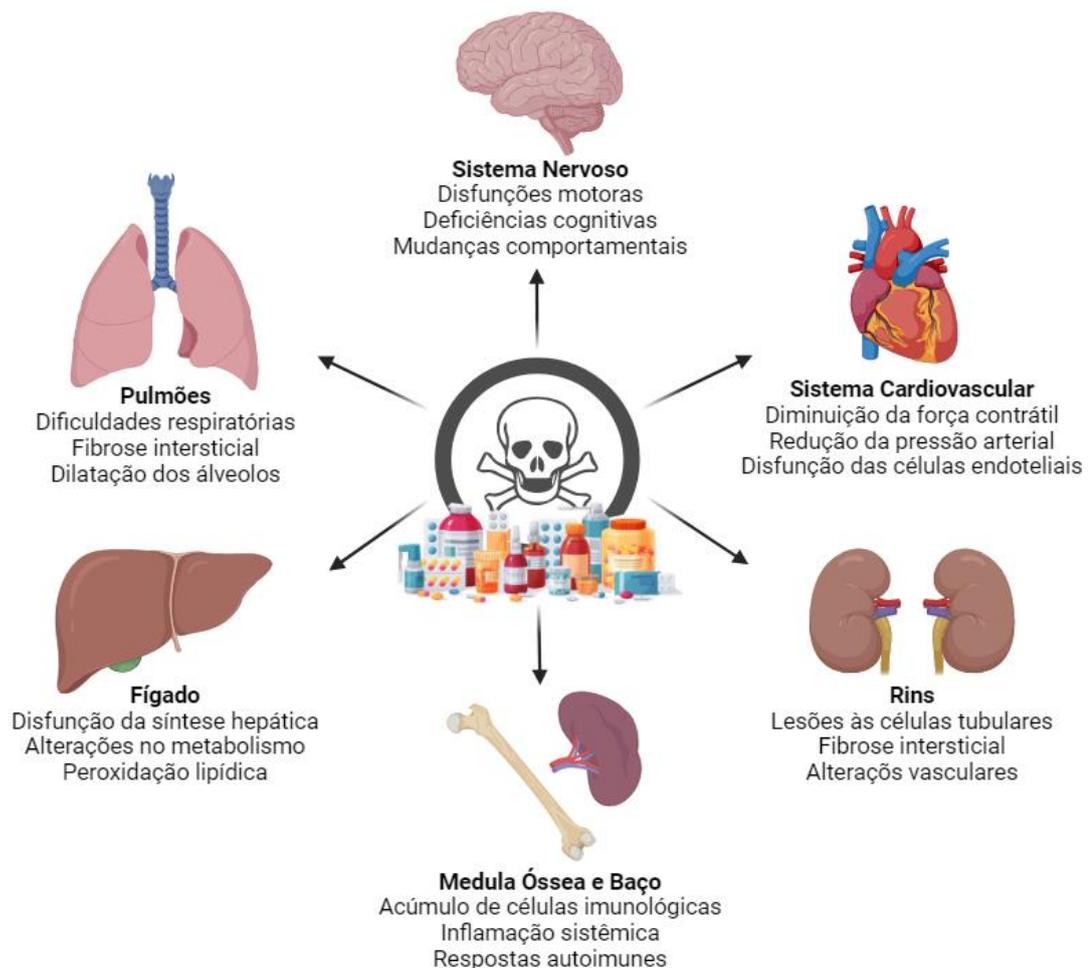
2.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NOVOS COMPOSTOS

2.5.1 Substâncias Tóxicas e seus Efeitos no Organismo

A ação tóxica de uma droga ou de qualquer outro produto químico com propriedades venenosas deve ser descrita em termos bioquímicos para explicar os distúrbios fisiológicos que são observados no organismo (BARNES; PAGET, 1965). Esse conceito definido há muito tempo por Barnes & Paget (1965) torna evidente a necessidade de investigar o íntimo dos órgãos em busca de respostas para elucidar os diversos mecanismos toxicológicos inerentes à ação de xenobióticos em geral e, por isso, é importante que abordagens com esta finalidade sejam o foco de cada vez mais estudos científicos na atualidade. A Figura 7 ilustra alguns efeitos causados por compostos tóxicos aos principais sistemas do organismo.

Nessa perspectiva, toxicidade aguda é caracterizada por um ou mais efeitos indesejados que ocorrem imediatamente ou em um curto intervalo de tempo após a administração única ou múltipla de uma substância (CHINEDU; AROME; AMEH, 2013). Esses efeitos geralmente são produtos de deficiências funcionais em órgãos ou alterações bioquímicas que podem interferir no funcionamento do organismo em geral. Desse modo, reações adversas a medicamentos e outros xenobióticos tóxicos podem ser classificadas como reações “no alvo” ou “fora do alvo” (ANTOINE et al., 2009). As reações “no alvo” podem ser previstas a partir da farmacologia primária conhecida da droga e muitas vezes são evitadas pela redução da dose, sendo raramente fatais. Por outro lado, as reações “fora do alvo” não são comumente previstas, podendo ser graves e levar à morte.

Figura 7. Principais efeitos provocados por substâncias tóxicas ao organismo.



Fonte: Autor (2023). A ação tóxica de xenobióticos pode promover variados efeitos desfavoráveis ao bom funcionamento dos órgãos e sistemas do corpo humano.

Como órgão metabólico primário, o fígado é o mais suscetível a efeitos tóxicos após exposição do corpo a compostos externos (TEKA et al., 2021). De acordo com a literatura, alterações na função mitocondrial, consumo exacerbado de agentes do sistema antioxidante e alterações no metabolismo de ácidos graxos estão entre os principais mecanismos associados ao desenvolvimento de hepatotoxicidade por ingestão de substâncias (ZHUANG et al., 2020). Isso pode ser explicado pela formação de metabólitos químicos reativos a partir da biotransformação hepática de drogas, que podem se ligar a ácidos nucleicos, proteínas celulares e lipídios, levando a danos no DNA, perda da função da proteína e peroxidação lipídica (SHEHU; MA; VENKATARAMANAN, 2017).

Além do fígado, numerosas substâncias também podem causar danos graves aos rins. As duas principais vias que medeiam a depuração de drogas – filtração glomerular e secreção tubular – promovem uma elevada exposição das células tubulares a compostos potencialmente nefrotóxicos por meio do contato apical ou transporte basolateral (PARAZELLA, 2019). Como consequência disso, lesões renais agudas tendem a estimular a fibrogênese tecidual, o que aumenta consideravelmente o risco para o desenvolvimento e progressão de doença renal crônica (BUDU et al., 2021). Ademais, compostos com capacidade de interferir sobre o sistema imunológico podem causar alterações importantes na função dos rins, visto que promovem vasoconstrição dos capilares renais, diminuem a produção de NO e aumentam a expressão de TGF- β 1, uma importante citocina associada à nefrotoxicidade por fibrose intersticial (OLYAEI; MATTOS; BENNETT, 2001).

Os sistemas cardiovascular e respiratório também podem ser alvos de compostos tóxicos, principalmente àqueles inalados ou administrados na forma de *sprays* (PATOWARY et al., 2020). No entanto, devido à importante função transportadora dos vasos sanguíneos e da intrínseca troca de substâncias entre os tecidos periféricos e o sangue, compostos aplicados por qualquer via de administração são capazes de atingir o coração e os pulmões. Tais substâncias podem causar, por exemplo, diminuição da força contrátil do miocárdio, redução da pressão arterial e disfunções das células endoteliais (CARLISLE et al., 2016). Por sua vez, o estresse oxidativo é o responsável pela maior parte dos efeitos causados por compostos tóxicos às células pulmonares (ZUO et al., 2018).

Ademais, a estrutura e função normais do sistema nervoso também podem ser alteradas como resultado da exposição a alguns xenobióticos. A ideia de que

uma substância química pode afetar o cérebro e de que a primeira expressão de toxicidade pode ser encontrada no comportamento, pensamento ou humor alterados não é recente (NEEDLEMAN, 1995). Nesse sentido, um amplo espectro de mudanças comportamentais está relacionado com os efeitos tóxicos de compostos exógenos, que podem incluir diminuição da capacidade de perceber estímulos sensoriais e de produzir respostas motoras, além de prejuízos à função cognitiva e psicossocial dos indivíduos (CORY-SLECHTA et al., 2001).

2.5.2 Toxicidade do Polissacarídeo Sulfatado de *S. filiformis*

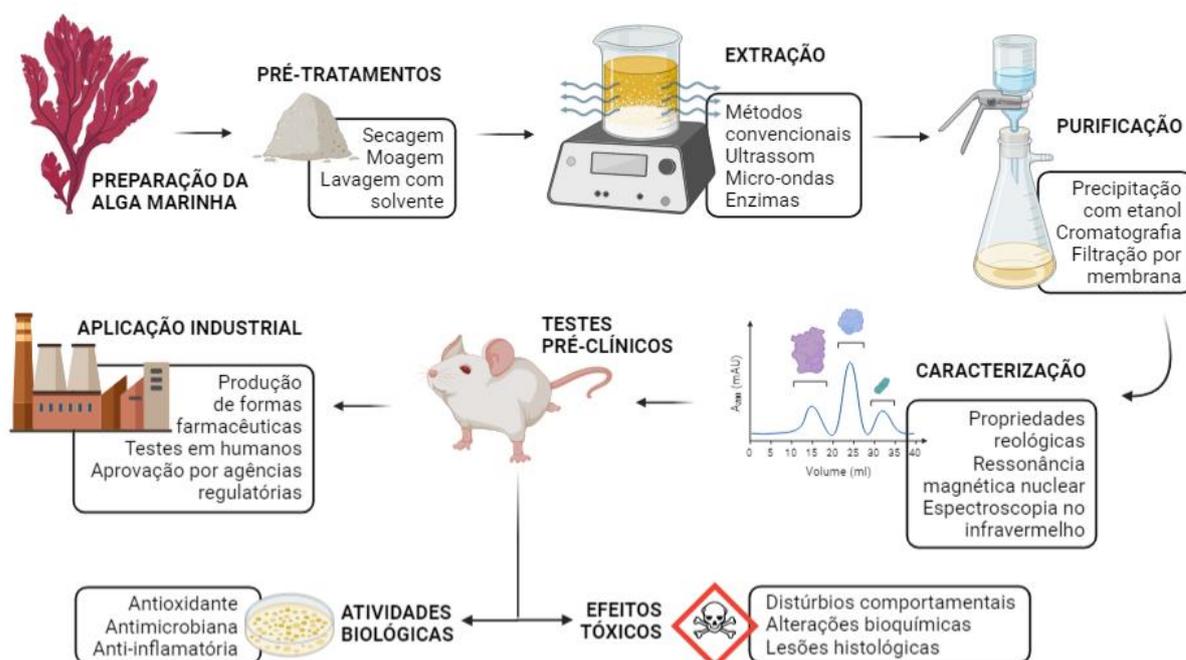
A partir da elucidação das diversas atividades biológicas apresentadas pelos polissacarídeos extraídos de algas marinhas, a avaliação de possíveis efeitos de toxicidade se torna importante para garantir sua segurança terapêutica. Segundo a literatura, a toxicidade induzida por drogas é considerada a principal problemática relacionada à descoberta e desenvolvimento de novos compostos bioativos (LIN et al., 2003). Por esse motivo, um dos aspectos mais relevantes para estas moléculas deve ser o equilíbrio entre seus efeitos terapêuticos e toxicológicos, garantindo, assim, a validação dos seus benefícios para a saúde (CRUZ et al., 2020).

Nessa perspectiva, a realização de estudos de toxicidade em animais é vital para determinar a segurança de novos compostos medicinais, permitindo definir doses adequadas para testes a longo prazo e, principalmente, indicar os órgãos possivelmente afetados ao final do tratamento (AL-AFIFI et al., 2018). Além disso, é requisito científico, ético e regulatório que a segurança de qualquer potencial novo medicamento seja investigada em animais antes de ser administrado em seres humanos. Para isso, o guia 423 da OCDE descreve as etapas e normas para o estudo pré-clínico de toxicidade de novas substâncias e sugere a utilização de uma alta dose do composto testado, cuja probabilidade de produzir toxicidade seja elevada, num período de 14 dias a partir da sua administração (OECD/OCDE, 2001). Assim, o estudo toxicológico pode fornecer informações iniciais sobre seu modo de ação tóxica, além de atuar como base para sua classificação.

Diferentes análises podem ser realizadas para determinar se um novo composto induz efeitos tóxicos em animais experimentais (Figura 8). Compreender a relação entre o peso corporal e o peso absoluto dos órgãos, por exemplo, permite ao patologista desvendar alterações muitas vezes despercebidas na avaliação

macroscópica preliminar (PIAO; LIU; XIE, 2013). Além disso, marcadores bioquímicos no sangue também são usados para elucidar eventos renais e hepáticos adversos, contribuindo para a investigação de danos causados às células de órgãos vitais (ABDALLA et al., 2018). A avaliação de sinais clínicos e mudanças comportamentais, bem como o emprego de técnicas histopatológicas, também são imprescindíveis para a análise de toxicidade de substâncias exógenas ao organismo (MALONE; ROBICHAUD, 1962; TRAN; TRAN, 2021).

Figura 8. Etapas de desenvolvimento de novos compostos bioativos.



Fonte: Autor (2023). A avaliação dos efeitos tóxicos de novos compostos é uma das etapas essenciais para a produção de drogas eficazes e seguras.

Apesar disso, poucos trabalhos abordam a temática da toxicidade pré-clínica de compostos naturais, principalmente tratando-se dos polissacarídeos sulfatados. Dentre eles, um estudo realizado por Quinderé et al. (2013), utilizando o polissacarídeo sulfatado de *Acanthophora muscoides*, demonstrou que não houve alterações significativas induzidas pela molécula nos órgãos dos animais testados, sendo evidenciado pela ausência de lesões histológicas e pelos valores normais dos parâmetros bioquímicos (QUINDERÉ et al., 2013). Por outro lado, Coura et al. (2012) relatou que a administração do polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria cornea* gerou um ligeiro aumento no tamanho do baço, além de apresentar discreta dilatação tubular e vascular nos rins e rara degeneração microvesicular nas fibras

cardíacas, o que, embora sejam consideradas alterações reversíveis, despertam a atenção para a necessidade de estudos com essa finalidade (COURA et al., 2012).

No que diz respeito à *S. filiformis*, pesquisas vêm sendo realizadas utilizando outras moléculas com grande potencial biológico, como as lectinas. À semelhança dos polissacarídeos, lectinas extraídas desta alga marinha também têm demonstrado atividades biológicas promissoras, incluindo efeitos antitumorais e antibacterianos (CHAVES et al., 2018; HOLANDA et al., 2005). Nessa perspectiva, em um estudo realizado por Abreu et al. (2016), foi evidenciada a ausência de efeitos tóxicos relevantes de uma lectina extraída de *S. filiformis* em camundongos, apresentando, ao exame microscópico, uma leve vacuolização citoplasmática reversível nas células do fígado (ABREU et al., 2016).

Entretanto, trabalhos que indiquem a segurança terapêutica do polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* permanecem escassos. A problemática se torna ainda mais relevante haja vista que esta molécula tem se apresentado como uma das mais promissoras para o estudo e desenvolvimento de formas terapêuticas eficazes para diferentes condições clínicas, conforme relatado anteriormente (SOUSA et al., 2016a; ASSREUY et al., 2010; ARAÚJO et al., 2017). Seu amplo espectro de atividades biológicas já demonstrou ser uma valiosa fonte de possibilidades de aplicações nas ciências biomédicas e, por isso, uma análise toxicológica do polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* deve ser tratado como prioridade para o seguimento dos estudos sobre seus efeitos para a promoção da saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a segurança terapêutica de um polissacarídeo sulfatado extraído a partir da alga marinha *Solieria filiformis* em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar o peso corporal e o comportamento geral (*screening* hipocrático) em animais submetidos à administração do polissacarídeo sulfatado.

b) Analisar macroscopicamente os órgãos de animais submetidos à administração do polissacarídeo sulfatado.

c) Determinar os níveis de marcadores bioquímicos de função renal e hepática dos animais submetidos à administração do polissacarídeo sulfatado.

d) Investigar as alterações histológicas dos órgãos de animais submetidos à administração do polissacarídeo sulfatado.

4 METODOLOGIA

4.1 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DE *SOLIERIA FILIFORMIS*

A alga marinha *S. filiformis* foi coletada na praia de Flexeiras (3°13'11.0'S 39°16'21.5"W), na costa atlântica do nordeste brasileiro, Trairí-CE, sendo depositada posteriormente no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE. A extração do polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* (referido aqui como PS-Sf) foi realizada por digestão enzimática com papaína, conforme descrito anteriormente (SOUSA et al., 2016a).

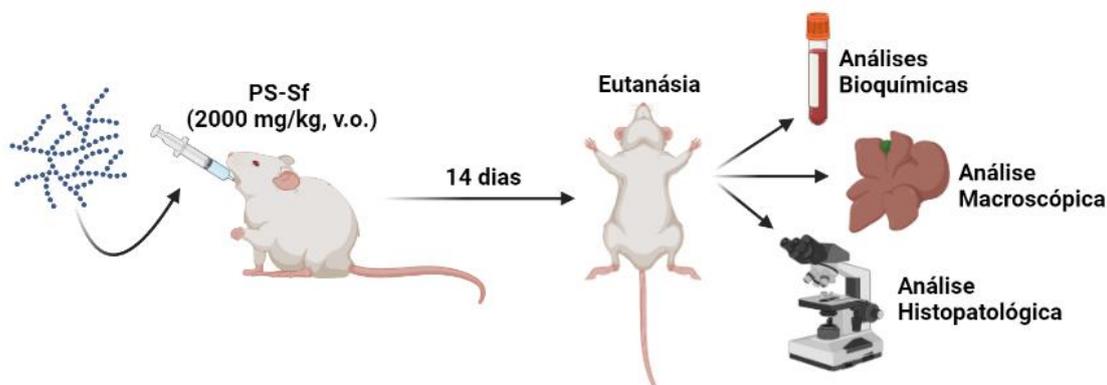
4.2 ANIMAIS

Camundongos BALB/c machos (25-30 g; 7-8 semanas) foram obtidos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE. Os animais foram alojados em sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), num ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à ração e água. Antes do início do protocolo, os animais foram submetidos a um jejum de 16-18 horas, mas com livre acesso à água. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE (Protocolo No. 38/2021).

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em dois grupos (n=3) de forma randomizada, seguindo o Guia 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (OECD/OCDE, 2001). O grupo tratado recebeu PS-Sf (2000 mg/kg, v.o.), enquanto o grupo controle recebeu apenas solução salina. Os camundongos foram monitorados por 14 dias para avaliação do peso corporal e mudanças comportamentais (*screening* hipocrático). No 14º dia, o sangue foi coletado para análises bioquímicas e, após eutanásia, os órgãos (coração, baço, rins, fígado e pulmões) foram identificados, removidos, fotografados, pesados e amostras foram coletadas para análise histopatológica (Figura 9).

Figura 9. Representação do protocolo experimental de toxicidade do PS-Sf.



Fonte: Autor (2023). Os animais receberam PS-Sf (2000 mg/kg, v.o.) e, após 14 dias, o sangue foi coletado para análises bioquímicas, os órgãos foram retirados, fotografados e pesados, e amostras foram coletadas para análise histopatológica.

4.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL – SCREENING HIPOCRÁTICO

A análise dos aspectos clínicos dos animais foi realizada nos dias 0 e 14 do protocolo experimental, como descrito previamente (MALONE; ROBICHAUD, 1962). Os parâmetros analisados incluem peso corporal, atividade motora, irritabilidade, resposta ao toque, aperto da cauda, contorção, endireitamento, cianose, tônus corporal, força de agarrar, ataxia, reflexo corneal, tremores, convulsões, cauda de Straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, respiração e morte.

4.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

No último dia experimental, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) + xilazina (8 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) e o sangue foi coletado por punção no plexo venoso retro-orbital e colocado em tubo contendo anticoagulante para avaliação bioquímica. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min e os níveis de albumina, glicose, colesterol total, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, ureia e creatinina foram analisados conforme protocolo estabelecido pelo fabricante (Labtest®, São Paulo, Brasil).

4.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA DOS ÓRGÃOS

Após eutanásia, os principais órgãos dos animais (coração, baço, rins, fígado e pulmões) foram localizados e removidos para avaliação macroscópica, como características de cor, forma, tamanho e aspecto. O peso relativo dos órgãos foi determinado utilizando a seguinte equação (Eq. 1):

$$\text{Peso relativo} = \frac{\text{Peso absoluto}}{\text{Peso corporal}} \times 25 \quad \text{Eq. 1}$$

Os resultados foram expressos em gramas por 25 gramas de peso corporal (g/25g).

4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS

Amostras dos órgãos foram fixadas em formaldeído a 10% por 24 horas, seguido de transferência para álcool a 70% até a realização das análises. Posteriormente, o material foi processado e em seguida incluído em parafina. Secções de 4 μm de espessura foram colocadas em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação qualitativa dos fragmentos. As lâminas foram examinadas por um histopatologista sem o conhecimento dos grupos experimentais utilizando-se um microscópio óptico (aumento de 400 \times).

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (EPM). Os testes estatísticos foram realizados no software Graphpad Prism (versão 5.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por teste t de Student, sendo consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta avaliação toxicológica mostrou que o polissacarídeo sulfatado extraído de *S. filiformis* (PS-Sf) é terapeuticamente seguro para sua administração em animais experimentais. Os resultados gerados com o ganho de peso corporal e com a avaliação dos parâmetros comportamentais revelaram que o PS-Sf não possui efeitos de toxicidade aguda aos camundongos testados com a dose oral de 2000 mg/kg. Ademais, o estudo macroscópico e histopatológico dos principais órgãos também serviu para reforçar esta hipótese, uma vez que não foram evidenciadas alterações morfológicas ou lesões teciduais comumente provocadas por compostos tóxicos. Estes achados também foram corroborados pela ausência de alterações nos valores de parâmetros bioquímicos, dosados a partir da coleta de amostras sanguíneas dos animais após o 14^o dia do protocolo experimental, indicando que a administração do PS-Sf é livre de efeitos de toxicidade aguda.

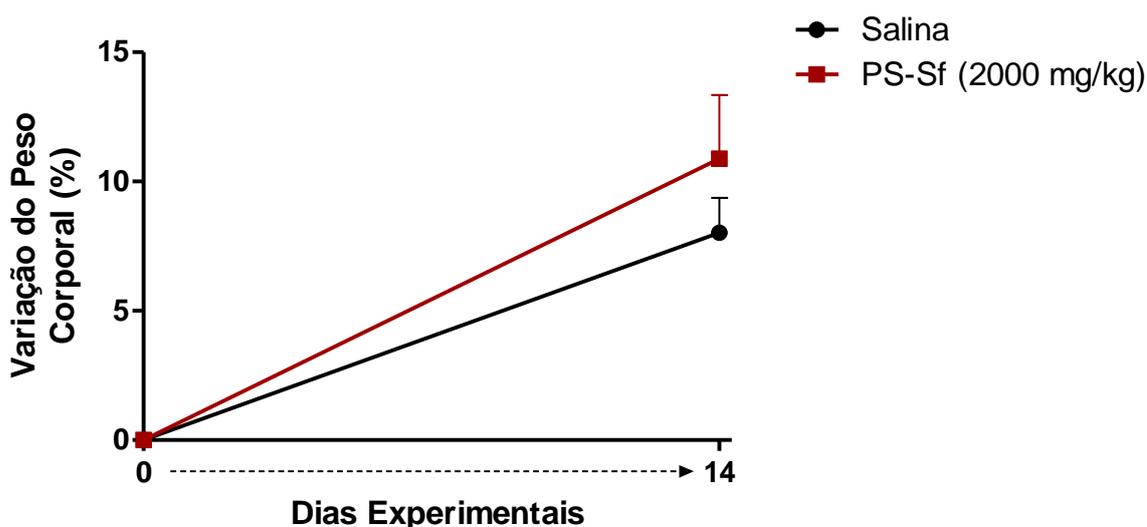
A literatura mostra que o polissacarídeo sulfatado da alga marinha *S. filiformis* tem se tornado um dos candidatos mais promissores para estudos envolvendo compostos naturais e sua aplicação na biomedicina. Como descrito anteriormente, carrageninas de *S. filiformis* preveniram o dano gástrico induzido pelo etanol por regular a formação de EROs e a peroxidação lipídica (SOUSA et al., 2016a), bem como atenuaram significativamente a atividade viral do HSV-1 (ANA et al., 2021), apresentando um potente efeito antioxidante *in vitro*. Aliado a isso, estudos também indicaram sua eficácia como um promissor agente anti-hipertensivo e analgésico, o que contribui para demonstrar a gama de possíveis alvos terapêuticos para aplicação desta molécula (ASSREUY et al., 2010; ARAÚJO et al., 2017).

Entretanto, é importante que sejam investigados efeitos adversos inerentes à utilização do polissacarídeo de *S. filiformis* para os órgãos e sistemas de animais experimentais, configurando uma etapa crucial na avaliação da segurança de novos agentes fitoterápicos. A OCDE, em seu guia 423, descreve os requisitos e métodos indicados para esta avaliação (OECD/OCDE, 2001). De modo geral, a substância testada deve ser administrada em dose única, por via oral, em um menor número possível de animais. Comumente, três animais são utilizados para esta finalidade e a dose escolhida deve ser aquela com maior probabilidade de produzir mortalidade em alguns dos animais tratados. Assim, o presente estudo propôs avaliar a ocorrência de efeitos de toxicidade aguda a partir da administração oral de um polissacarídeo

sulfatado extraído de *S. filiformis* em camundongos.

Os resultados obtidos mostraram que o PS-Sf não interferiu no ganho de peso corporal dos animais tratados com a dose oral de 2000 mg/kg, quando comparados ao grupo controle (Figura 10). De acordo com a literatura, alterações no peso corporal são frequentemente o primeiro sinal de toxicidade de uma substância em teste, sendo um parâmetro importante para a avaliação objetiva dos seus efeitos em animais (SIREERATAWONG et al., 2008; ABDALLA et al., 2018). Assim, após os 14 dias correspondentes ao protocolo experimental, os camundongos submetidos à administração do PS-Sf apresentaram um ganho médio de peso de 10,8%, enquanto o aumento foi de 8,0% nos animais que receberam apenas solução salina, não havendo diferença estatística entre os grupos.

Figura 10. Variação do peso corporal dos animais tratados com o PS-Sf.



Fonte: Autor (2023). O peso dos animais foi avaliado nos dias 0 e 14 do protocolo experimental. Os resultados são expressos como a média \pm EPM (n=3).

De modo contrário, Jothy et al. (2010), em seu estudo com sementes extraídas de *Cassia fistula*, relataram que alterações ponderais podem se tornar preocupantes se a perda de peso corporal for superior a 10% do peso inicial (JOTHY et al., 2011). Estes dados vão de encontro aos resultados mostrados no presente estudo, visto que os animais que receberam o PS-Sf apresentaram crescimento e aquisição de massa corpórea aceitáveis para o período de tempo avaliado. Além disso, observações como estas são importantes porque a ocorrência de distúrbios

do metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras ou emagrecimento pode afetar o crescimento dos animais, e tais mudanças estão comumente relacionadas à ingestão de compostos de ação tóxica ao organismo (GHELANI; CHAPALA; JADAV, 2016). Portanto, a ausência dessas alterações sugere que o PS-Sf não apresenta efeito tóxico agudo sobre o crescimento normal dos camundongos.

Tabela 5. *Screening* hipocrático dos animais tratados com 2000 mg/kg do PS-Sf.

Parâmetro	Dia 0		Dia 14	
	Salina	PS-Sf	Salina	PS-Sf
Atividade motora	N	N	N	N
Irritabilidade	NE	NE	E	E
Resposta ao toque	N	N	N	N
Aperto da cauda	N	N	N	N
Contorção	NE	NE	NE	NE
Endireitamento	N	N	N	N
Cianose	NE	NE	NE	NE
Tônus corporal	N	N	N	N
Força de agarrar	N	N	N	N
Ataxia	NE	NE	NE	NE
Reflexo corneal	N	N	N	N
Tremores	NE	NE	NE	NE
Convulsões	NE	NE	NE	NE
Cauda de Straub	NE	NE	NE	NE
Hipnose	NE	NE	NE	NE
Anestesia	NE	NE	NE	NE
Lacrimação	NE	NE	NE	NE
Ptose	NE	NE	NE	NE
Micção	N	N	N	N
Defecação	N	N	N	N
Piloereção	NE	NE	E	E
Respiração	N	N	N	N
Nº de mortes	0	0	0	0

Legenda: Normal, N; Encontrado, E; Não Encontrado, NE.

Fonte: Autor (2023).

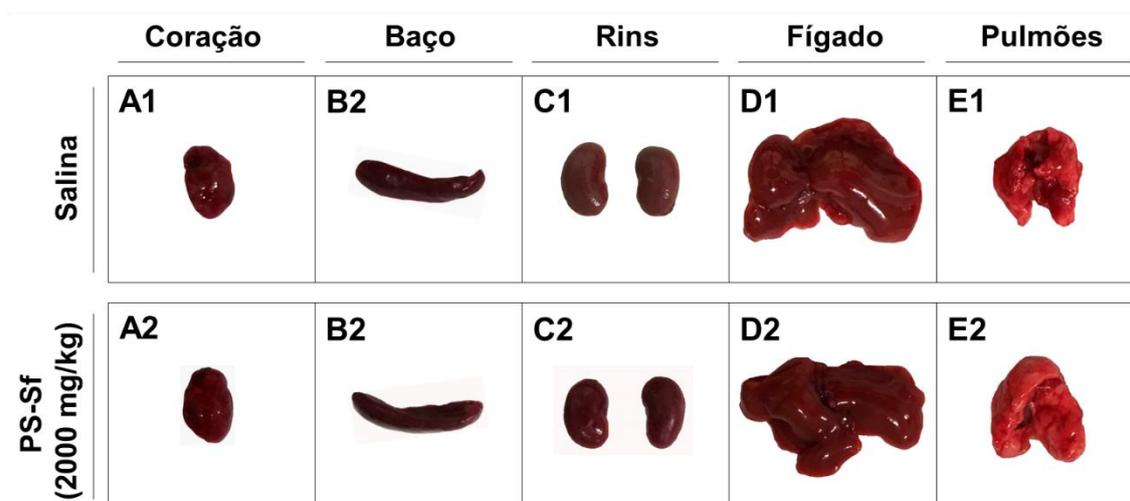
Outro parâmetro relevante para o estudo de toxicidade aguda é a análise do comportamento geral dos animais. A triagem hipocrática é frequentemente usada para fornecer uma estimativa geral da natureza de um determinado composto, permitindo uma exploração qualitativa preliminar de suas propriedades tóxicas

(MAHON et al., 2014). Dessa forma, a Tabela 5 mostra que, comparativamente ao grupo controle, os aspectos e funções fisiológicas, como micção, defecação e respiração, não foram alterados a partir da administração do PS-Sf, mantendo-se preservados também parâmetros que incluem força de agarrar, tônus corporal e atividade motora dos animais. A ausência de letalidade ou sinais de intoxicação também contribui para demonstrar a segurança terapêutica da dose oral do PS-Sf em camundongos (MOREIRA et al., 2021).

Ademais, durante os 14 dias de avaliação, não houve sinais claros de sofrimento ou estresse nos animais tratados com o PS-Sf. O curto período de irritabilidade evidenciado em ambos os grupos está relacionado ao manuseio dos camundongos para a realização da administração das substâncias e das análises posteriores, sendo sinais comuns em animais experimentais (AL-AFIFI et al., 2018). A aparência física, como pele, pelos, olhos, mucosas e salivação foram considerados normais. Além disso, a ausência de alterações quanto à resposta ao toque, aperto da cauda e reflexos corneais podem sugerir que o PS-Sf não causou efeitos depressivos indesejados ao sistema nervoso dos animais (MOREIRA et al., 2021). Também não foram observados sinais de tremores, convulsões ou hipnose nos animais testados com o PS-Sf, corroborando com os achados previamente relatados. Juntos, esses resultados reforçam a hipótese de que o PS-Sf não possui efeitos tóxicos agudos sobre o comportamento dos camundongos.

Por meio da observação macroscópica, também foram avaliados os possíveis efeitos tóxicos do PS-Sf sobre órgãos vitais dos animais, incluindo coração, baço, rins, fígado e pulmões. Assim, seguindo os parâmetros morfológicos descritos por Tran & Tran (2021), os resultados do presente estudo mostraram que a aparência dos órgãos dos animais foi notavelmente semelhante entre o grupo tratado com o PS-Sf e o grupo controle (Figura 11), não havendo alterações relevantes quanto à sua localização, forma, tamanho, cor ou textura (TRAN; TRAN, 2021). O coração apresentava-se como uma pirâmide vermelha sólida de três lados e os pulmões eram rosados, macios e levemente esponjosos. Por sua vez, o fígado possuía uma forma triangular com uma cúpula lisa sobre a superfície diafragmática, enquanto que os rins e o baço eram marrom-avermelhados, ambos envoltos em um saco fibroso. Portanto, esses achados sugerem que o PS-Sf a 2000 mg/kg não apresenta efeito tóxico agudo sobre os principais órgãos dos camundongos.

Figura 11. Aspectos morfológicos dos órgãos dos animais tratados com o PS-Sf.



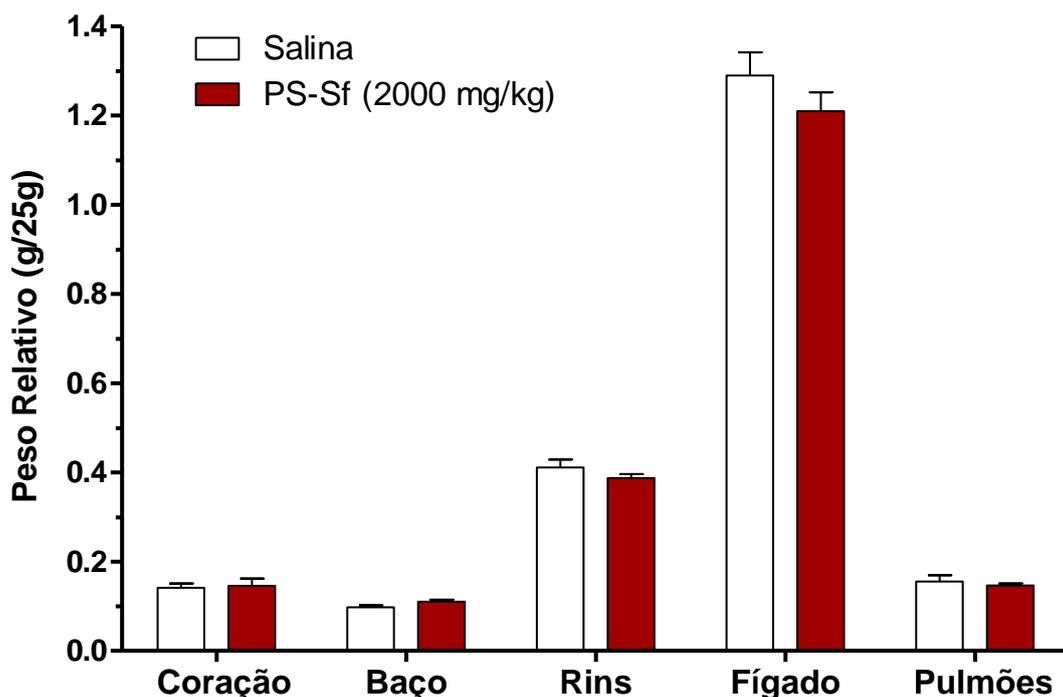
Fonte: Autor (2023). A avaliação macroscópica dos órgãos foi realizada no grupo salina (A1-E1) e no grupo tratado com o PS-Sf (A2-E2).

Aliado à avaliação do peso corporal, alterações no peso dos órgãos também são uma boa indicação de danos causados pela ingestão de uma substância tóxica, sendo, talvez, o teste mais sensível para a avaliação de toxicidade aguda (PIAO; LIU; XIE, 2013). A explicação para que isso ocorra se baseia nas interações desfavoráveis entre certos compostos e órgãos vitais, podendo levar à destruição e inflamação celular que se reflete na mudança da relação órgão/corpo, ou seja, no peso relativo dos órgãos (SCHMIDT et al., 2007). Por exemplo, mudanças no peso do fígado podem indicar alterações no metabolismo hepático devido à destruição dos hepatócitos (JEMITSU; NISHIMURA; NAKAYOSHI, 1986), ao passo que uma variação importante no peso dos rins é um sinal característico de desnutrição ou atrofia induzida pela redução do consumo de água (FARIA et al., 2020). Assim, corroborando com os resultados morfológicos aqui apresentados, não foram observadas diferenças significativas no peso relativo dos órgãos dos animais administrados com o PS-Sf em comparação ao grupo controle (Figura 12).

A fim de avaliar se o PS-Sf possuía efeitos de toxicidade aguda sobre a função dos principais órgãos, alguns marcadores bioquímicos foram analisados após o término do período experimental. A importância dos biomarcadores para o progresso da pesquisa biomédica tem sido cada vez mais reconhecida universalmente, uma vez que ajudam no rastreamento de reações adversas de novos compostos, aceleram o ritmo e reduzem os entraves no desenvolvimento de medicamentos (ANTOINE et al., 2009). Dessa forma, marcadores de lesão hepática

e renal, bem como indicadores de distúrbios do metabolismo, são recomendados pela literatura para esta análise (TRAN & TRAN, 2021). A Tabela 6 traz os resultados obtidos a partir da dosagem sanguínea desses biomarcadores nos animais submetidos à administração do PS-Sf.

Figura 12. Peso relativo dos órgãos dos animais tratados com o PS-Sf.



Fonte: Autor (2023). O peso relativo dos órgãos foi calculado em gramas por 25 gramas de peso corporal. Os resultados são expressos como a média \pm EPM (n=3).

Nesta perspectiva, o presente estudo mostrou que não houve alterações significativas nos níveis séricos de albumina após a administração do PS-Sf, quando comparado ao grupo controle. Partindo-se do pressuposto de que a albumina é a proteína de ligação mais abundante na corrente sanguínea, e de que é responsável pelo transporte de vários compostos, como bilirrubina, hormônios e drogas exógenas (FARIA et al., 2020), a ausência de alterações quanto aos seus níveis sugere um ponto favorável para a validação da segurança do PS-Sf. Esse achado também permite concluir indiretamente que o PS-Sf não promoveu condições adversas graves, como desnutrição, síndrome nefrótica, insuficiência cardíaca ou respostas inflamatórias agudas, cujo nível de albumina no sangue poderia apresentar-se consideravelmente reduzido (GATTA; VERARDO; BOLOGNESI, 2012). Ademais, a

ausência de declínio da albumina sérica nos animais que receberam o PS-Sf demonstra, ainda, que a molécula não interferiu na síntese hepática desta proteína (KAWAGUCHI et al., 2021).

Tabela 6. Marcadores bioquímicos de função renal e hepática dos animais tratados com o PS-Sf.

Parâmetro	Salina	PS-Sf (2000 mg/kg)
Albumina (g/dL)	2,15 ± 0,18	2,23 ± 0,08
Glicose (mg/dL)	111,02 ± 3,23	117,40 ± 8,87
Colesterol total (mg/dL)	123,50 ± 8,05	120,70 ± 5,71
ALT (U/L)	45,56 ± 4,04	44,09 ± 2,45
AST (U/L)	85,53 ± 3,45	86,26 ± 4,37
Fosfatase alcalina (U/L)	57,46 ± 5,79	59,58 ± 3,59
Ureia (mg/dL)	53,37 ± 6,24	50,03 ± 3,20
Creatinina (mg/dL)	0,29 ± 0,03	0,30 ± 0,03

Legenda: Valores expressos como média ± EPM.

Fonte: Autor (2023).

Os parâmetros bioquímicos também auxiliam na avaliação do metabolismo geral do organismo. Dentre estes, a dosagem de glicose sérica é um dos testes que mais refletem metabolicamente o estado fisiológico dos animais submetidos ao estudo de toxicidade, visto que pode ser alterada por diferentes fatores, como mudanças na dieta ou na absorção intestinal (FONSECA et al., 2018). Nesse sentido, os níveis séricos de glicose dos camundongos testados com o PS-Sf foram estatisticamente semelhantes àqueles observados no grupo controle, indicando que o PS-Sf não interfere na regulação da glicemia. Corroborando com esses resultados, a administração oral do PS-Sf pareceu não interferir no metabolismo lipídico, uma vez que não houve diferenças significativas nos valores de colesterol total entre o grupo tratado e os animais que receberam apenas solução salina. Isso se torna relevante porque o colesterol é considerado potencialmente perigoso quando presente em níveis elevados na corrente sanguínea, sendo um dos principais fatores de risco cardiovascular (SHENG et al., 2006).

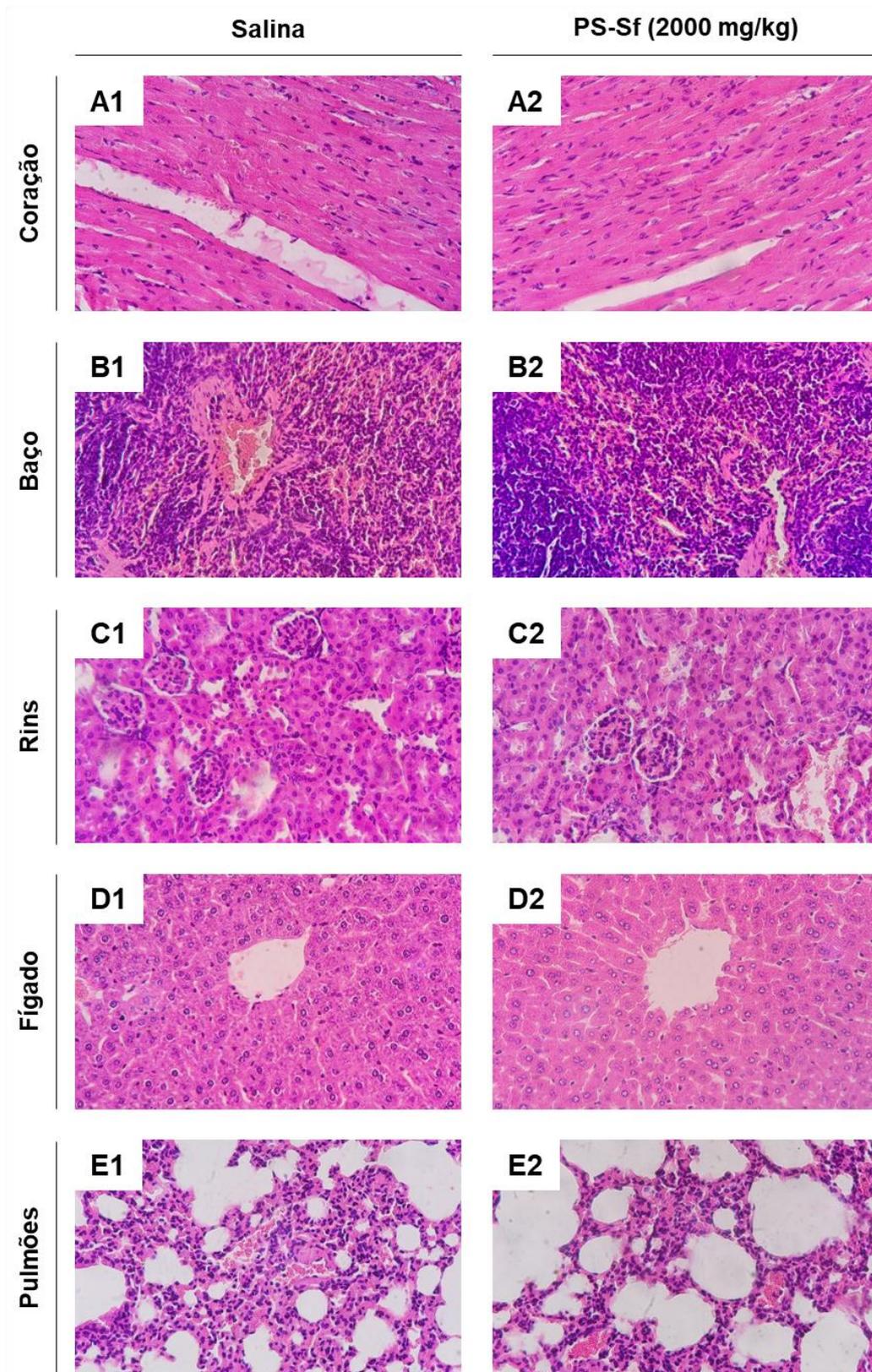
Adicionalmente, a integridade do fígado também foi avaliada para evidenciar possíveis lesões das células hepáticas induzidas pelo PS-Sf. O fígado desempenha uma importante papel na digestão, metabolismo e armazenamento de nutrientes, além de atuar na detoxificação de xenobióticos (MAHON et al., 2014). Nesse sentido, é de conhecimento universal que enzimas produzidas no fígado, como ALT

e AST, são importantes marcadores de hepatotoxicidade (ANTOINE et al., 2009; RAMAIAH, 2007). Segundo Abdalla et al. (2018), as transaminases hepáticas, principalmente a ALT, podem apresentar-se elevadas no sangue em mais de três vezes o nível basal em condições tóxicas (ABDALLA et al., 2018). Aliado a isso, embora também seja produzida por outros órgãos, os níveis séricos de fosfatase alcalina também auxiliam no diagnóstico de distúrbios do fígado e dos ductos biliares (TANG et al., 2020). Assim, os resultados mostraram que os valores de ALT, AST e fosfatase alcalina não foram alterados pela administração oral do PS-Sf quando comparados ao grupo controle, demonstrando a ausência de efeitos hepatotóxicos.

Por sua vez, os níveis sanguíneos de ureia e creatinina são importantes biomarcadores de disfunção renal, permitindo avaliar possíveis efeitos tóxicos de xenobióticos às células tubulares (BUDU et al., 2021; EZEJA; ANAGA; ASUZU, 2014). Elevação nos valores destas moléculas pode estar relacionada, por exemplo, a um aumento do catabolismo proteico ou, mais gravemente, a uma redução na taxa de filtração glomerular e do *clearance* renal, interferindo diretamente na homeostasia (TAYEB et al., 2012). Em contrapartida, o presente estudo revelou que os camundongos submetidos à administração do PS-Sf apresentaram níveis séricos normais de ureia e creatinina, não havendo diferença significativa em comparação aos animais que receberam apenas solução salina. Assim, tomadas em conjunto, as avaliações bioquímicas serviram para sustentar a hipótese de que o PS-Sf não possui efeitos de toxicidade aguda aos órgãos dos camundongos.

De maneira complementar, a busca por alterações histológicas é considerada um teste essencial para a avaliação da segurança de novos compostos bioativos (OECD/OCDE, 2001). É importante que todos os animais em teste, incluindo aqueles que morrerem durante a avaliação, sejam submetidos ao exame histopatológico dos órgãos para revelar lesões ocultas macroscopicamente. Além disso, segundo alguns autores, a análise microscópica dos órgãos pode ser classificada como padrão-ouro para a avaliação de possíveis efeitos de toxicidade em animais experimentais (AL-AFIFI et al., 2018; JOTHY et al., 2011). Assim, o presente estudo avaliou a arquitetura tecidual dos principais órgãos dos camundongos, destacando sua organização estrutural e integridade de suas células. A Figura 13 mostra fotomicrografias de cortes histológicos do coração, baço, rins, fígado e pulmões dos animais testados com o PS-Sf ou solução salina.

Figura 13. Fotomicrografias dos órgãos dos animais tratados com o PS-Sf.



Fonte: Autor (2023). A avaliação histopatológica dos órgãos foi realizada no grupo salina (A1-E1) e no grupo tratado com o PS-Sf (A2-E2).

Dentre os órgãos, o fígado se torna, facilmente, o primeiro alvo de toxicidade aguda de substâncias exógenas, especialmente quando ingeridas por via enteral (RHIOUANI et al., 2008) e, portanto, uma análise detalhada de sua estrutura foi de fundamental importância para este estudo. Efeitos diretos às células do fígado costumam ser o principal mecanismo de toxicidade hepática induzida por drogas (TEKA et al., 2021). No entanto, não foram observadas lesões como vacuolização de hepatócitos ou presença de núcleos picnóticos nas células dos animais testados com o PS-Sf, além de não existir sinais de necrose, congestão ou acúmulo de ácidos graxos. Alterações no número de células de Kupffer ou regiões hemorrágicas também não foram encontradas na análise histopatológica do fígado. Esses resultados reforçam os achados bioquímicos e mostram que o PS-Sf não apresenta efeito tóxico agudo contra as células hepáticas dos camundongos.

Ademais, numa avaliação microscópica do córtex renal, os animais que receberam a dose oral do PS-Sf não demonstraram evidências de degeneração do corpúsculo renal e dos glomérulos renais. Também não foram relatados deterioração dos túbulos proximais e distais, congestão vascular ou edema intersticial nos camundongos testados, sendo comparativamente semelhantes ao grupo controle. A literatura descreve a ocorrência de consequências graves à fisiologia renal devido a danos provocados por drogas e outras substâncias (PERAZELLA, 2019). Dentre elas, a síndrome nefrótica se destaca por ser uma das manifestações patológicas mais importantes clinicamente, sendo caracterizada por uma redução na pressão osmótica plasmática que leva à formação de edema, derrame pleural, hipoperfusão renal e/ou hiperaldosteronismo secundário (RADI, 2019). Assim, os resultados do presente estudo sugerem que a administração do PS-Sf não provoca nefrotoxicidade aguda aos camundongos.

Por fim, efeitos tóxicos típicos também costumam afetar a arquitetura tecidual e funções dos sistemas respiratório e cardiovascular. A ocorrência de síndrome coronariana aguda, cardiomegalia ou apneia por fibrose pulmonar estão geralmente associada a administração de compostos de ação tóxica ao organismo (PATOWARY et al., 2020; CARLISLE et al., 2016). Nessa perspectiva, o estudo histopatológico do coração e dos pulmões revelou fibras musculares cardíacas normais e estruturas alveolares bem preservadas, respectivamente, tanto no grupo controle quanto nos animais submetidos à administração do PS-Sf. Como evidenciado anteriormente, também não foram observados sinais de congestão, edema, inflamação ou

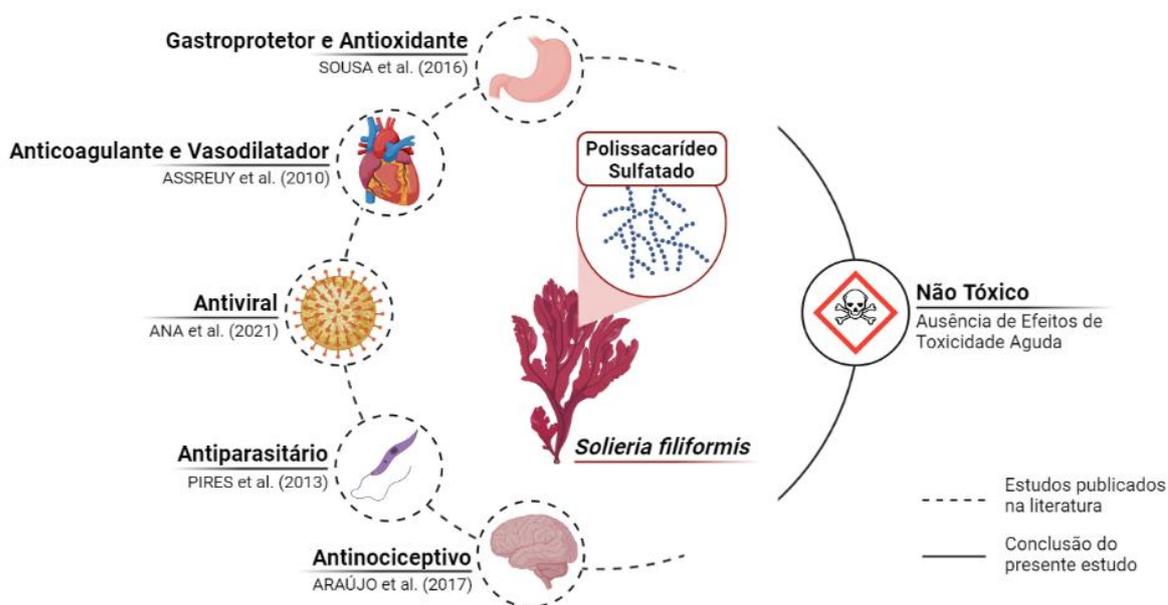
hemorragia. De maneira similar, as células do baço também se mantiveram preservadas mesmo após a administração do PS-Sf, sendo comparáveis àquelas encontradas no grupo controle. Portanto, os resultados obtidos contribuem para demonstrar a segurança terapêutica do PS-Sf para os órgãos e sistemas dos camundongos.

Uma vez que foi demonstrado que o polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* não apresenta efeitos de toxicidade aguda em camundongos, outras avaliações pré-clínicas também são pertinentes para a adequada concretização do conhecimento a respeito da temática. Estudos de toxicidade subcrônica e crônica, por exemplo, são considerados importantes para a confirmação dos achados aqui demonstrados. Para isso, os guias 408 e 452 da OCDE sugerem maiores períodos de avaliação – 90 dias e 12 meses, respectivamente – permitindo uma análise mais aprofundada da segurança toxicológica de novos compostos a longo prazo (OECD/OCDE, 2018a; OECD/OCDE, 2018b). Desse modo, os resultados obtidos no presente estudo servem de suporte e incentivo para as próximas pesquisas envolvendo polissacarídeos de algas marinhas, especialmente aquele extraído de *S. filiformis*.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha *S. filiformis* não apresenta efeitos de toxicidade aguda em camundongos testados com a dose oral de 2000 mg/kg (Figura 14). Os dados obtidos a partir da variação do peso corporal dos animais, bem como dos parâmetros comportamentais mais relevantes, indicam que o PS-Sf não interfere no crescimento, na locomoção ou nos reflexos normais dos camundongos. Além disso, os achados macroscópicos revelaram que o PS-Sf não altera as principais características dos órgãos dos animais, sendo assegurados pela avaliação positiva dos seus pesos relativos. Por último, as análises bioquímicas e histopatológicas confirmaram a ausência de lesões teciduais e, assim, sugerem que não houve evento tóxico agudo relacionado à administração do PS-Sf. Portanto, este estudo serviu para demonstrar a segurança pré-clínica do polissacarídeo sulfatado de *S. filiformis* e contribuir para a pesquisa e o desenvolvimento de novas ferramentas biomédicas para a promoção da saúde.

Figura 14. Resumo ilustrativo do potencial do PS-Sf para a promoção da saúde.



Fonte: Autor (2023). Os resultados da avaliação de toxicidade aguda se somam aos estudos prévios a respeito das atividades biológicas do PS-Sf e reafirmam a grande relevância desta molécula para as ciências biomédicas.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, Y. O. A. et al. Acute and 28-day sub-acute intravenous toxicity studies of 1'-S-1'-acetoxychavicol acetate in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 356, p. 204–213, 2018.
- ABREU, T. M. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Lectin from Marine Red Alga *Solieria filiformis*. **Planta Medica**, v. 82, n. 7, p. 596–605, 2016.
- AL-AFIFI, N. A. et al. Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 50, 2018.
- ALE, M. T.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. **Marine Drugs**, v. 9, n. 10, p. 2106–2130, 2011.
- ALVES, A. et al. Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 15, p. 2194–2200, 2010.
- ANA, P. et al. Anti-Herpes simplex virus (HSV-1) activity and antioxidant capacity of carrageenan-rich enzymatic extracts from *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 322–330, 2021.
- ANDRYUKOV, B. G. et al. Sulfated polysaccharides from marine algae as a basis of modern biotechnologies for creating wound dressings: Current achievements and future prospects. **Biomedicines**, v. 8, n. 9, 2020.
- ANTOINE, D. J. et al. Mechanism-based bioanalysis and biomarkers for hepatic chemical stress. **Xenobiotica**, v. 39, n. 8, p. 565–77, 2009.
- ARAÚJO, I. W. F. et al. Analgesic and anti-inflammatory actions on bradykinin route of a polysulfated fraction from alga *Ulva lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 820–830, 2016.
- ARAÚJO, I. W. F. et al. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 160–167, 2017.
- ARRIECHE, D. et al. Secondary Metabolites Isolated from Chilean Marine Algae: A Review. **Marine Drugs**, v. 20, n. 5, 2022.
- ARYEE, A. N.; AGYEI, D.; AKANBI, T. O. Recovery and utilization of seaweed pigments in food processing. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 113–119, 2018.
- ASSREUY, A. M. S. et al. Vascular effects of a sulfated polysaccharide from the red marine alga *Solieria filiformis*. **Natural product communications**, v. 5, n. 8, p. 1267–72, 2010.

- BARBA, F. J. et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 96–109, 2016.
- BARNES, J. M.; PAGET, G. E. Mechanisms of toxic action. **Progress in medicinal chemistry**, v. 4, p. 18–38, 1965.
- BARROS, F. C. N. et al. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 598–603, 2013.
- BATISTA, J. A. et al. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 59–67, 2014.
- BAYU, A.; HANDAYANI, T. High-value chemicals from marine macroalgae: Opportunities and challenges for marine-based bioenergy development. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 209, n. 1, 2018.
- BESEDNOVA, N. N. et al. Extracts and marine algae polysaccharides in therapy and prevention of inflammatory diseases of the intestine. **Marine Drugs**, v. 18, n. 6, p. 1–18, 2020.
- BEZERRA, F. F. et al. Antidiarrheal activity of a novel sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cervicornis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 27–35, 2018.
- BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014.
- BRADING, J. W. E.; GEORG-PLANT, M. M. T.; HARDY, D. M. The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. **Journal of the Chemical Society**, p. 319–324, 1947.
- BRIEGER, K. et al. Reactive oxygen species: From health to disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, 2012.
- BRITO, T. V. et al. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1161–1170, 2014.
- BRITO, T. V. et al. Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 957–964, 2016.
- BUDU, A. et al. Renal fibrosis due to multiple cisplatin treatment is exacerbated by kinin B1 receptor antagonism. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 12, 2021.
- CAO, S. et al. Anticoagulant and antithrombotic properties in vitro and in vivo of a novel sulfated polysaccharide from marine green alga *Monostroma nitidum*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 4, p. 1–21, 2019.
- CARLISLE, M. et al. Chlorine-induced cardiopulmonary injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1374, n. 1, p. 159–167, 2016.

- CARNEIRO, J. G. et al. Peripheral antinociception and anti-inflammatory effects of sulphated polysaccharides from the alga *Caulerpa mexicana*. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 115, n. 4, p. 335–342, 2014.
- CARNEIRO, J. G. et al. Gastroprotective effects of sulphated polysaccharides from the alga *Caulerpa mexicana* reducing ethanol-induced gastric damage. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018.
- CARREIRA-CASAS, A. et al. Benefits and drawbacks of ultrasound-assisted extraction for the recovery of bioactive compounds from marine algae. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 17, 2021.
- CHAGAS, F. D. S. et al. Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 415–421, 2020.
- CHAROENSIDDHI et al. The development of seaweed-derived bioactive compounds for use as prebiotics and nutraceuticals using enzyme technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 70, p. 20–33, 2017.
- CHAVES, R. P. et al. Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1320–1329, 2018.
- CHEN, J. H. et al. Growth-inhibitory effect of a fucoidan from brown seaweed *Undaria pinnatifida* on *Plasmodium* parasites. **Parasitology Research**, v. 104, n. 2, p. 245–250, 2009.
- CHEN, O.; DONNELLY, C. R.; JI, R. R. Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 62, p. 17–25, 2020.
- CHEONG, K. L. et al. Oligosaccharides derived from red seaweed: Production, properties, and potential health and cosmetic applications. **Molecules**, v. 23, n. 10, 2018.
- CHI, Y. et al. Effect of extraction techniques on properties of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their applicability in iron chelation. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 616–623, 2018.
- CHINEDU, E.; AROME, D.; AMEH, F. S. A new method for determining acute toxicity in animal models. **Toxicology International**, v. 20, n. 3, p. 224–226, 2013.
- CITKOWSKA, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Possibilities of fucoidan utilization in the development of pharmaceutical dosage forms. **Marine Drugs**, v. 17, n. 8, 2019.
- CORY-SLECHTA, D. A. et al. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. I: Behavioral effects. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 79–91, 2001.
- COSTA, D. S. et al. Sulphated Polysaccharide Isolated from the Seaweed *Gracilaria caudata* Exerts an Antidiarrhoeal Effect in Rodents. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 118, n. 6, p. 440–448, 2016.

- COSTA, L. E. C. et al. Chemical structure, anti-inflammatory and antinociceptive activities of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria intermedia* algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 966–975, 2020.
- COURA, C. O. et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 110, n. 4, p. 335–341, 2012.
- CRUZ, L. F. et al. Umbelliferone (7-hydroxycoumarin): A non-toxic antidiarrheal and antiulcerogenic coumarin. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110432, 2020.
- DAMASCENO, S. R. B. et al. Role of the NO/K_{ATP} pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 320–328, 2013.
- DENIAUD-BOUËT, E. et al. A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. **Carbohydrate Polymers**, v. 175, p. 395–408, 2017.
- DINESH, S. et al. In vitro anti-HIV-1 activity of fucoidan from *Sargassum swartzii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 83–88, 2016.
- EZEJA, M. I.; ANAGA, A. O.; ASUZU, I. U. Acute and sub-chronic toxicity profile of methanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 3, p. 1155–1164, 2014.
- FARIA, W. C. S. et al. Acute and subacute oral toxicity assessment of dry encapsulated and non-encapsulated green coffee fruit extracts. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 28, n. 2, p. 337–355, 2020.
- FIGUEROA, F. A. et al. Sulfated Polysaccharide Extracted from the Green Algae *Codium bernabei*: Physicochemical Characterization and Antioxidant, Anticoagulant and Antitumor Activity. **Marine Drugs**, v. 20, n. 7, p. 458, 2022.
- FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, n. 1, p. 182–205, 1998.
- FONSECA, A. G. et al. In Vivo and in Vitro Toxicity Evaluation of Hydroethanolic Extract of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves. **Journal of Toxicology**, v. 2018, p. 1–8, 2018.
- FRIES, J. F. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastropathy: Incidence and risk factor models. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 213–222, 1991.
- GATTA, A.; VERARDO, A.; BOLOGNESI, M. Hypoalbuminemia. **Internal and Emergency Medicine**, v. 7, n. S3, p. 193–199, 2012.
- GHELANI, H.; CHAPALA, M.; JADAV, P. Diuretic and antiurolithiatic activities of an ethanolic extract of *Acorus calamus* L. rhizome in experimental animal models. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 6, n. 4, p. 431–436, 2016.
- HAHN, T. et al. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1691–1698, 2012.

HANNAN, M. A. et al. Phytosterols of marine algae: Insights into the potential health benefits and molecular pharmacology. **Phytomedicine**, v. 69, 2020.

HANS, N.; MALIK, A.; NAIK, S. Antiviral activity of sulfated polysaccharides from marine algae and its application in combating COVID-19: Mini review. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100623, 2021.

HAO, H. et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of a novel polysaccharide from green alga *Caulerpa racemosa* var *peltata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 891–900, 2019.

HAYASHI, K. et al. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 1, p. 109–116, 2008.

HIDARI, K. I. P. J. et al. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, n. 1, p. 91–95, 2008.

HOLANDA, M. L. et al. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 12, p. 1769–1773, 2005.

HU, Y. et al. Gastric protective activities of fucoidan from brown alga *Kjellmaniella crassifolia* through the NF- κ B signaling pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 893–900, 2020.

JE, J. G. et al. Purification and structural characterization of sulfated polysaccharides derived from brown algae, *sargassum binderi*: Inhibitory mechanism of iNOs and COX-2 pathway interaction. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, 2021.

JIAO, G. et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196–233, 2011.

JOTHY, S. L. et al. Acute Oral Toxicity of Methanolic Seed Extract of *Cassia fistula* in Mice. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 5268–5282, 2011.

KADAM, S. U.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4667–4675, 2013.

KAWAGUCHI, K. et al. Decline in serum albumin concentration is a predictor of serious events in nonalcoholic fatty liver disease. **Medicine**, v. 100, n. 31, p. e26835, 2021.

KHOTIMCHENKO, M. et al. Antitumor potential of carrageenans from marine red algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 246, p. 116568, 2020.

KIM, D.; KANG, S. M. Red Algae-Derived Carrageenan Coatings for Marine Antifouling Applications. **Biomacromolecules**, v. 21, n. 12, p. 5086–5092, 2020.

KNUTSEN, S. H. et al. A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans. **Botanica Marina**, v. 37, n. 2, p. 163–170, 1994.

KRUSTEV, E.; RIOUX, D.; MCDOUGALL, J. J. Mechanisms and Mediators That Drive Arthritis Pain. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 4, p. 216–224, 2015.

- LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765–1774, 2007.
- LE, B. et al. Preparation, Characterization, and Anti-Adhesive Activity of Sulfate Polysaccharide from *Caulerpa lentillifera* against *Helicobacter pylori*. **Polymers**, v. 14, n. 22, 2022.
- LEE, W. K.; HO, C. L. Ecological and evolutionary diversification of sulphated polysaccharides in diverse photosynthetic lineages: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, p. 118764, 2022.
- LEKSHMI, V.S; RAUF, A. A.; KURUP, G. M. Sulfated polysaccharides from the edible marine algae *Padina tetrastromatica* attenuates isoproterenol-induced oxidative damage via activation of PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway - An in vitro and in vivo approach. **Chemico-Biological Interactions**, v. 308, p. 258–268, 2019.
- LI, N. et al. Structural characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Codium divaricatum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 175–182, 2015.
- LIMA, R. F. et al. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 11, p. 1415–1421, 2004.
- LIN, J. et al. The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity in Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 10, p. 1125–1154, 2003.
- LIU, Y. et al. Inhibitory Effect of Depolymerized Sulfated Galactans from Marine Red Algae on the Growth and Adhesion of Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 12, p. 1–16, 2019.
- LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008.
- MAHON, C. P. C. A. N. et al. Toxicological evaluation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 665–671, 2014.
- MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320-332, 1962.
- MATSUBARA, K. et al. Antiangiogenic properties of a sulfated galactan isolated from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 1, p. 87–90, 2003.
- MEDVEDEVA, Y. V.; KIM, M. S.; USACHEV, Y. M. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca^{2+} signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 20, p. 5295–5311, 2008.
- MENAA, F. et al. Ecological and Industrial Implications of Dynamic Seaweed-Associated Microbiota Interactions. **Marine Drugs**, v. 18, n. 12, p. 1–25, 2020.
- MENSHOVA, R. V. et al. Fucoidans from brown alga *Fucus evanescens*: Structure and biological activity. **Frontiers in Marine Science**, v. 3, p. 1–9, 2016.

MICHEL, A. S.; MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 195–200, 1997.

MOREIRA, L. A. et al. Acute toxicity, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of the orally administered crostamine in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, n. 8, p. 1703–1711, 2021.

NEEDLEMAN, H. L. Behavioral toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 77–79, 1995.

NORZIAH, M. H.; CHING, C. Y. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. **Food Chemistry**, v. 68, n. 1, p. 69–76, 2000.

OECD/OCDE. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. **Organization for Economic Cooperation and Development**, Test n.423, 2001.

OECD/OCDE. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. **Organization for Economic Cooperation and Development**, Test n.408, 2018a.

OECD/OCDE. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Chronic Toxicity Studies. **Organization for Economic Cooperation and Development**, Test n.452, 2018b.

OHTA, Y. et al. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 5, p. 892–898, 2009.

OLIVEIRA, F. F. B. et al. Sulfated polysaccharide from *Gracilaria caudata* reduces hypernociception and inflammatory response during arthritis in rodents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1061–1069, 2020.

OLYAEI, A. J.; DE MATTOS, A. M.; BENNETT, W. M. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: New insight and preventive strategies. **Current Opinion in Critical Care**, v. 7, n. 6, p. 384–389, 2001.

PARK, A. Y. et al. Modulation of Gene Expression in a Sterile Atopic Dermatitis Model and Inhibition of Staphylococcus aureus Adhesion by Fucoidan. **Dermatopathology**, v. 8, n. 2, p. 69–83, 2021.

PASTERNAK, G. W. Opiate pharmacology and relief of pain. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 16, p. 1655–1661, 2014.

PATOWARY, P. et al. Cardiopulmonary function and dysregulated cardiopulmonary reflexes following acute oleoresin capsicum exposure in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 405, p. 115188, 2020.

PERAZELLA, M. A. Drug-induced acute kidney injury: Diverse mechanisms of tubular injury. **Current Opinion in Critical Care**, v. 25, n. 6, p. 550–557, 2019.

PEREIRA JÚNIOR, L. C. et al. Protective effect against gastric mucosa injury of a sulfated agaran from *Acanthophora spicifera*. **Carbohydrate Polymers**, v. 261, p. 117829, 2021.

- PIAO, Y.; LIU, Y.; XIE, X. Change Trends of Organ Weight Background Data in Sprague Dawley Rats at Different Ages. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 1, p. 29–34, 2013.
- PIRES, C. L. et al. Evaluation of macroalgae sulfated polysaccharides on the *Leishmania (L.) amazonensis* promastigote. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 934–943, 2013.
- POMIN, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans: A systematic review. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, n. 1, p. 1–12, 2010.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, n. 12, p. 1016–1027, 2008.
- QIN, S.; LIN, H.; JIANG, P. Advances in genetic engineering of marine algae. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1602–1613, 2012.
- QUEIROZ, I. N. L. et al. Inhibition of coagulation proteases and thrombosis and sub-chronic toxicological study of a sulfated polysaccharidic fraction from the red alga *Gelidiella acerosa*. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 36, n. 4, p. 393–401, 2014.
- QUINDERÉ, A. L. G. et al. Peripheral antinociception and anti-edematogenic effect of a sulfated polysaccharide from *Acanthophora muscoides*. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 3, p. 600–613, 2013.
- QURESHI, D. et al. Carrageenan: A Wonder Polymer from Marine Algae for Potential Drug Delivery Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 11, p. 1172–1186, 2019.
- RADI, Z. A. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. **International Journal of Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 215–227, 2019.
- RAMAIAH, S. K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1551–1557, 2007.
- RAMOS-ROMERO, S. et al. Edible microalgae and their bioactive compounds in the prevention and treatment of metabolic alterations. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 1–16, 2021.
- RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, A. M. B.; MORAIS, R. M. S. C. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2967–3028, 2015.
- REVIERS, B.; LEPROUX, A. Characterization of polysaccharides from *Enteromorpha intestinalis* (L.) link, chlorophyta. **Carbohydrate Polymers**, v. 22, n. 4, p. 253–259, 1993.
- RHIOUANI, H. et al. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 378–386, 2008.

- RIBEIRO, N. A. et al. Sulfated polysaccharide from the green marine algae *Caulerpa racemosa* reduces experimental pain in the rat temporomandibular joint. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 253–260, 2020.
- ROBLEDO, D. R.; GARCÍA-REINA, G. Apical callus formation in *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) cultured in tanks. **Hydrobiologia**, v. 260–261, n. 1, p. 401–406, 1993.
- RODRIGUES, D. et al. Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the Central West Coast of Portugal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 12, p. 3177–3188, 2015.
- SCHMIDT, B. M. et al. Toxicological evaluation of a chicory root extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 7, p. 1131–1139, 2007.
- SHANG, Y.; FILIZOLA, M. Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 763, p. 206–213, 2015.
- SHEHU, A. I.; MA, X.; VENKATARAMANAN, R. Mechanisms of Drug-Induced Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 35–54, 2017.
- SHENG, L. et al. Mechanism of hypolipidemic effect of crocin in rats: Crocin inhibits pancreatic lipase. **European Journal of Pharmacology**, v. 543, n. 1–3, p. 116–122, 2006.
- SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, 2012.
- SILVA, T. H. et al. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. **Biomatter**, v. 2, n. 4, p. 278–289, 2012a.
- SILVA, R. O. et al. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p. 2618–2633, 2012b.
- SIREERATAWONG, S. et al. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from root of *Sida rhombifolia* Linn. in rats. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 729–737, 2008.
- SOUSA, A. A. S. et al. A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 173–180, 2013.
- SOUSA, W. M. et al. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 140–148, 2016a.
- SOUSA, N. A. et al. The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 865–875, 2016b.

SOUZA, C. Á. P. B. et al. Orofacial antinociceptive effect of sulphated polysaccharide from the marine algae *Hypnea pseudomusciformis* in rodents. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 261–269, 2019.

TABARSA, M. et al. Molecular characteristics and immunomodulatory activities of water-soluble sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 2, p. 135–144, 2012.

TALARICO, L. B. et al. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1–2, p. 63–71, 2004.

TANG, W. et al. Effect of ultrasonic treatment on the physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 305–312, 2016.

TANG, X. et al. Acute and Subchronic Oral Toxicity Study of Gardenia Yellow E500 in Sprague-Dawley Rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 2, p. 531, 2020.

TASHIRO, A.; OKAMOTO, K.; BEREITER, D. A. Morphine modulation of temporomandibular joint-responsive units in superficial laminae at the spinomedullary junction in female rats depends on estrogen status. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2065–2074, 2008.

TAYEB, W. et al. Biochemical and histological evaluation of kidney damage after sub-acute exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rats: Involvement of oxidative stress. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 22, n. 9, p. 696–704, 2012.

TEBAY, L. E. et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 108–146, 2015.

TEKA, T. et al. *Polygonum multiflorum*: Recent updates on newly isolated compounds, potential hepatotoxic compounds and their mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 271, p. 113864, 2021.

TERASAWA, M. et al. Anti-influenza A virus activity of rhamnan sulfate from green algae *Monostroma nitidum* in mice with normal and compromised immunity. **Marine Drugs**, v. 18, n. 5, 2020.

TRAN, P. N. T.; TRAN, T. T. N. Evaluation of Acute and Subchronic Toxicity Induced by the Crude Ethanol Extract of *Plukenetia volubilis* Linneo Leaves in Swiss Albino Mice. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–13, 2021.

TRIBOLLET, A. D.; SCHILS, T.; VROOM, P. S. Spatio-temporal variability in macroalgal assemblages of American Samoa. **Phycologia**, v. 49, n. 6, p. 574–591, 2010.

UEMITSU, N.; NISHIMURA, C.; NAKAYOSHI, H. Evaluation of liver weight changes following repeated administration of carbon tetrachloride in rats and body-liver weight relationship. **Toxicology**, v. 40, n. 2, p. 181–190, 1986.

- VÉLIZ, K. et al. Seasonal variation of carrageenans from *Chondracanthus chamissoi* with a review of variation in the carrageenan contents produced by Gigartinales. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 6, p. 3139–3150, 2017.
- WANG, L. et al. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. **Mar Drugs**, v. 12, n. 9, p. 4984–5020, 2014.
- WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.
- WANG, W. et al. Inhibition of influenza A virus infection by fucoidan targeting viral neuraminidase and cellular EGFR pathway. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–14, 2017.
- WASSIE, T. et al. Extraction Techniques, Biological Activities and Health Benefits of Marine Algae *Enteromorpha prolifera* Polysaccharide. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, n. October, p. 1–13, 2021.
- WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 6–12, 2012.
- XIE, X. T.; CHEONG, K. L. Recent advances in marine algae oligosaccharides: structure, analysis, and potential prebiotic activities. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 28, p. 7703–7717, 2022.
- XU, S. Y.; HUANG, X.; CHEONG, K. L. Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. **Marine Drugs**, v. 15, n. 12, p. 1–16, 2017.
- YOU, Y. et al. Structural characterization and SARS-CoV-2 inhibitory activity of a sulfated polysaccharide from *Caulerpa lentillifera*. **Carbohydrate Polymers**, v. 280, p. 119006, 2022.
- YU, X. et al. Low molecular weight fucoidan alleviates cardiac dysfunction in diabetic Goto-Kakizaki rats by reducing oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis. **Journal of Diabetes Research**, v. 2014, 2014.
- YUAN, Y. et al. Microwave assisted hydrothermal extraction of polysaccharides from *Ulva prolifera*: Functional properties and bioactivities. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 902–910, 2018.
- ZHENG, H. et al. A Sulfated Polysaccharide from Red Algae (*Gelidium crinale*) to Suppress Cells Metastasis and MMP-9 Expression of HT1080 Cells. **Foods**, v. 11, n. 15, 2022.
- ZHOU, H. Y. et al. A new dicoumarin and anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. **Fitoterapia**, v. 80, n. 5, p. 283–285, 2009.
- ZHUANG, T. et al. Hepatoprotection and hepatotoxicity of Chinese herb Rhubarb (Dahuang): How to properly control the “General (Jiang Jun)” in Chinese medical herb. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 127, p. 110224, 2020.
- ZUO, H. et al. Toxic effects of fluoride on organisms. **Life Sciences**, v. 198, p. 18–24, 2018.

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 29 de julho de 2021

Ofício nº45/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Prof. Renan Oliveira Silva Damasceno
 Centro de Biociências
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia
 processo nº0038/2021

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica de polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas marinhas.**” registrado com o nº0038/2021 sob a responsabilidade da **Prof. Renan Oliveira Silva Damasceno** envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/07/2021

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/07/2021 a 31/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico
Nº de animais	252 animais
Peso/Idade	25 a 30g /12 meses 2
Sexo	Femea (105) Macho (147)
Origem: Biotério de Criação	Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

