



**PEDRO LUÍS ROLO
QUITÉRIO**

**CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS
PRESENTES NO SAL E SALINAS MARINHAS**



**PEDRO LUÍS ROLO
QUITÉRIO**

Caracterização de polissacarídeos presentes no sal e salinas marinhas

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Ramo da Bioquímica Alimentar, realizada sob orientação científica da Doutora Cláudia Nunes (orientadora), Pós-Doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva (co-orientador), Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente	Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro
Arguente	Doutor Fernando Jorge Andrade Gonçalves Professor adjunto no Departamento das indústrias Alimentares da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu
Orientador	Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva Professor associado com agregação do Departamento de Química Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, Doutora Cláudia Nunes e Professor Doutor Manuel António Coimbra por todo o apoio durante este ano, pelos conhecimentos transmitidos e pela disponibilidade para acompanhar o meu trabalho.

Agradeço também aos docentes do ICBAS e ao professor Manuel Vilanova pela oportunidade de realização dos ensaios bem como pela forma como fui recebido nas suas instalações.

Agradeço aos meus pais por me terem dado a possibilidade e incentivado à realização da dissertação e, em especial ao meu irmão, por todo o apoio e companheirismo nas horas de maior dificuldade.

Agradeço a todos os colegas do QOPNA pelo bom ambiente no local do trabalho que proporcionaram. Agradeço em especial ao João Calvão, João Cappelle, Alexandre, Zélia, Mikas, Ângelo, Andreia, Mariana, Cátia, Corália, Sónia, Teresa, Guido e Marco pela amizade e companheirismo durante o meu percurso académico bem como pela motivação que me foram transmitindo ao longo deste ano.

Agradeço especialmente à Inês por me ter apoiado incondicionalmente em todas as ocasiões, por me ter motivado sempre e ajudado nas maiores dificuldades.

Palavras-chave

Polissacarídeos sulfatados, algas, sal, água de salina, dessulfatação, atividade imunoestimuladora.

Resumo

Os ambientes marinhos são ricos em diversos compostos com atividade biológica, entre os quais se podem destacar os polissacarídeos sulfatados provenientes das algas. Estes, dependendo da sua origem, podem apresentar diversas estruturas. As algas vermelhas produzem galactanas sulfatadas, carragenanas e agaranas, as algas castanhas produzem fucoïdanas e as algas verdes produzem ulvanas. Como estes compostos possuem ligações muito resistentes à degradação microbiana, originando fragmentos muito solúveis em soluções aquosas, sendo expectável que haja a sua acumulação no sal e nas águas das salinas.

Assim, este trabalho teve como objetivo extrair, caracterizar e avaliar a atividade imunoestimuladora dos polissacarídeos sulfatados da água de salmoura das salinas de Aveiro e também dos polissacarídeos presentes no sal.

A amostra que apresentou a maior concentração de material polimérico foi a água recolhida do tanque de evaporação onde a água está mais concentrada em sal. O material polimérico extraído era composto maioritariamente por polissacarídeos e por material inorgânico, recolhido na forma de cinzas após incineração, e continha também proteínas.

Os principais resíduos que compõem os polissacarídeos sulfatados são os ácidos urónicos, seguindo-se a fucose, ramnose, galactose e glucose.

A identificação das ligações glicosídicas e da localização dos grupos sulfato foi feita por análise de metilação. Estas análises, realizadas às amostras antes e depois da dessulfatação, permitiram identificar a presença de fucose em ligação (1→3) e (1→4) substituídas com ésteres de sulfato, que são estruturas características das fucoïdanas. Foi também verificada a presença de ramnose sulfatada e em ligação (1→4), o que, juntamente com a presença de ácidos urónicos, permite identificar estruturas características das ulvanas. Foram também identificados resíduos de galactose em ligação (1→3) e (1→4), com diversas substituições com éster de sulfato, característicos de carragenanas e agaranas. Os ensaios de imunoestimulação *in vitro* em células do baço de ratinho indicaram que as amostras não são citotóxicas, e que os compostos presentes têm capacidade para estimular linfócitos B. As amostras dessulfatadas não apresentaram este efeito, o que permite inferir que os ésteres de sulfato são fundamentais para a atividade imunoestimuladora destes polissacarídeos. Este trabalho permitiu concluir que o sal e as águas de salina são uma boa fonte de polissacarídeos sulfatados e que estas amostras apresentam potencial para serem utilizadas como imunoestimulador.

keywords

Sulfated polysaccharides, seaweed, salt, salt water, desulfation, immunostimulatory activity

abstract

Marine environments are rich in several compounds with biological activity, among which the sulfated polysaccharides from algae. These, depending on their origin, may have different structures. Red algae have sulfated galactans, carrageenan and agarans, brown seaweeds have fucoidans, and ulvans are characteristic from green algae. As these compounds are more resistant to microbial degradation enzymes, the resultant products are very soluble in aqueous solutions. This allows to expected their accumulation in sea salt and salt pans water.

This study aimed to extract, characterize and assess the immunostimulatory activity of sulfated polysaccharides from the Aveiro salt pans water and from sea salt. The sample with the highest concentration of polymeric material was collected from the water from the highest concentrated tank. The polymeric material is mainly composed by polysaccharides and inorganic material, collected as ash after incineration. It contains also a small content of proteins. The main residues comprising the sulfated polysaccharides are uronic acids, followed by fucose, rhamnose, galactose, and glucose. The identification of the glycosidic linkages and sulfate location was achieved by methylation analysis. The methylation carried out on samples before and after desulfation allowed to identify the presence of fucose in (1 → 3) and (1 → 4) linkages and substituted with sulfate esters, which are structures characteristic of fucoidans. Also, the presence of (1 → 4)-linked sulfated rhamnose, along with uronic acids, allowed to infer the presence of ulvans. (1 → 3) and (1 → 4)-linked galactose residues were also identified, with multiple substitutions by sulfate esters, which are characteristic of carrageenans and agarans.

The immunostimulatory assays on *in vitro* murine splenocyte cells indicated that the samples are not cytotoxic, and that the compounds are able to stimulate B lymphocytes. The desulfated samples did not show this effect, allowing to infer that the sulfate esters are relevant for their immunostimulatory activity. This study revealed that salt water concentrated in the salt pans is a good source of sulfated polysaccharides with immunostimulatory activity.

ÍNDICE	
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Salinas e sal	3
1.2. Polissacarídeos sulfatados	5
1.2.1 – Carragenanas	6
1.2.1.1. – Estrutura	6
1.2.1.2. – Origem	8
1.2.1.3. – Efeitos biológicos	10
1.2.2. – Agaranas	11
1.2.2.1. – Estrutura	11
1.2.2.2. – Origem	12
1.2.2.3. – Efeitos biológicos	14
1.2.3. – Fucoidanas	15
1.2.3.1. – Estrutura	15
1.2.3.2. – Origem	16
1.2.3.3. – Efeitos biológicos	18
1.2.4. – Ulvanas	19
1.2.4.1. – Estrutura	20
1.2.4.2. – Origem	21
1.2.4.3. – Efeitos biológicos	22
1.3. Objetivos do trabalho	23
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Obtenção das amostras	27
2.2. Análise de açúcares neutros	28
2.3. Análise de ácidos urónicos	29
2.4. Determinação de ésteres de sulfato	30
2.5. Determinação da proteína	31
2.6. Quantificação da matéria inorgânica	31
2.7. Análise de metilação	31
2.8. Dessulfatação	33
2.9. Atividade imunoestimuladora	33

2.10. Diagrama do trabalho realizado:	35
3 – RESULTADOS/DISCUSSÃO.....	37
3.1. Composição do material polimérico.....	39
3.2. Polissacarídeos do material polimérico.....	41
3.2.1. – Composição em monossacarídeos	41
3.2.2. – Análise de ligações glicosídicas	43
3.3. Avaliação da atividade imunoestimuladora	50
4 - CONCLUSÃO	53
5 – BIBLIOGRAFIA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de uma salina marinha [1].....	3
Figura 2 – Sal-gema [2].....	4
Figura 3 – Diversas colorações que o sal pode apresentar [3].	4
Figura 4 - Diferentes tipos de carragenanas provenientes de algas vermelhas.	7
Figura 5 – Carragenanas provenientes de <i>Sarconema scinaoides</i>	9
Figura 6- Carragenanas provenientes de <i>Halymenia floresii</i>	10
Figura 7 - Dissacarídeos repetitivos de agaranas.	12
Figura 8 - Estrutura repetitiva linear da agarana da alga <i>Laurencia thyrsoifera</i>	13
Figura 9 – Estrutura repetitiva linear da agarana das algas do género <i>Porphyra sp.</i>	13
Figura 10 - Dissacarídeos repetitivos de fucoidanas.	16
Figura 11 - Dissacarídeos repetitivos de fucoidanas sulfatados em C-2 e C-3.	16
Figura 12 - Dissacarídeos repetitivos de fucoidanas di-sulfatadas em C-2/C-4 e C-2/C-3 respetivamente.....	17
Figura 13 - Dissacarídeos repetitivos de fucoidanas substituídas com Ácido glucurónico e Xilose.	17
Figura 14 - Dissacarídeos repetitivos de Ulvanas: Ulvanas tipo A e Ulvanas Tipo B.	20
Figura 15 - Dissacarídeo repetitivo de ulvanas monosulfatados.....	21
Figura 16 - Dissacarídeo repetitivo de ulvanas monosulfatados e substituídas com xilose.	21
Figura 17 – Local de recolha de amostras na salina da universidade de Aveiro [159].	27
Figura 18 – Diagrama do trabalho realizado.	35
Figura 19 - Percentagem de viabilidade celular após incubação com a amostra. RPMI – Controlo negativo para imunoestimulação; LPS – Controlo positivo imunoestimulação.....	50
Figura 20 – Percentagem de estimulação para células B e células T. RPMI – Controlo negativo para imunoestimulação; LPS – Controlo positivo imunoestimulação	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela resumo dos polissacarídeos sulfatados de origem marinha.	6
Tabela 2 - Quantidade de material polimérico e a sua composição.	39
Tabela 3 – Composição em monossacarídeos das amostras de água de salina e sal.	42
Tabela 4 – Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de ramnose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.	44
Tabela 5 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de xilose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.	44
Tabela 6 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de fucose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.	45
Tabela 7 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de galactose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.	46
Tabela 8 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de glucose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.	47
Tabela 9 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de manose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.	48
Tabela 10 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de arabinose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.	48
Tabela 11 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de N-Acetilglucosamina presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS DAS AMOSTRAS

AC – Água do tanque de água concentrada da salina
AC DS - Água do tanque de água concentrada da salina dessulfatada
AE – Água do tanque de entrada da salina
AE DS – Água do tanque de entrada da salina dessulfatada
PAC – Precipitado da água do tanque de água concentrada da salina
PAC DS – Precipitado da água do tanque de água concentrada da salina dessulfatada
PAE – Precipitado da água do tanque de entrada da salina
PAE DS – Precipitado da água do tanque de entrada da salina dessulfatada

OUTRAS ABREVIATURAS

3,6-AnGal – 3,6-anidro-galactose
Á. Ur – Ácido urónicos
Ara - Arabinose
BHA - Hidroxianisol de butilo
BHT - Butil-hidroxitolueno
BSA - Albumina de soro bovino
COX-2 –Ciclo-oxigenase
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DPPH - 2,2- difenil -1- picrilhidrazil
dRib - dRibose
EtOH – Etanol
Fuc - Fucose
Gal- Galactose
GC-FID - Cromatógrafo de gás com detetor de ionização de chama
Glc - Glucose
GlcA – Ácido glucurónico
GlcNAc – N-acetilglucoseamina
HDL - Lipoproteína de alta densidade
IdoA – Ácido idurónico
IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LPS – Lipopolissacarídeo
Man - Manose
MeOH – Metanol
MFF - m-Fenilfenol
MMB - Complexo borano-4-metilmorfolina
MP – Material polimérico
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
NOS-2 – Enzima Óxido nítrico sintase
PGE2 - Prostaglandina E2
PSs – Polissacarídeos sulfatados
Rha - Ramnose

Rib - Ribose
RNA - Ácido ribonucleico
RPMI-1640 - Roswell Park Memorial Institute médium
Tampão PBS - Tampão fosfato-salino 0.01 M, pH 7.4
TCA - Ácido tricloroacético
TFA - Ácido trifluoroacético
Xyl - Xilose

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Salinas e sal

As salinas marinhas são estruturas construídas por ação humana e que permitem a produção de sal, através do efeito combinado do sol e do vento. Nestas estruturas a água salgada entra na salina pelos tanques de entrada e, devido à ação da gravidade, percorre os diversos tanques, aumentando a concentração em NaCl à medida que avança. A precipitação do sal ocorre no cristalizador quando a água atinge o ponto de cristalização ($S_{\text{NaCl}} = 35,92\text{g}/100\text{g}$ de solução aquosa a $25\text{ }^\circ\text{C}$) (Figura 1). A circulação da água nas salinas permite que haja a decantação natural de lamas, algas e outros sólidos presentes nas águas.

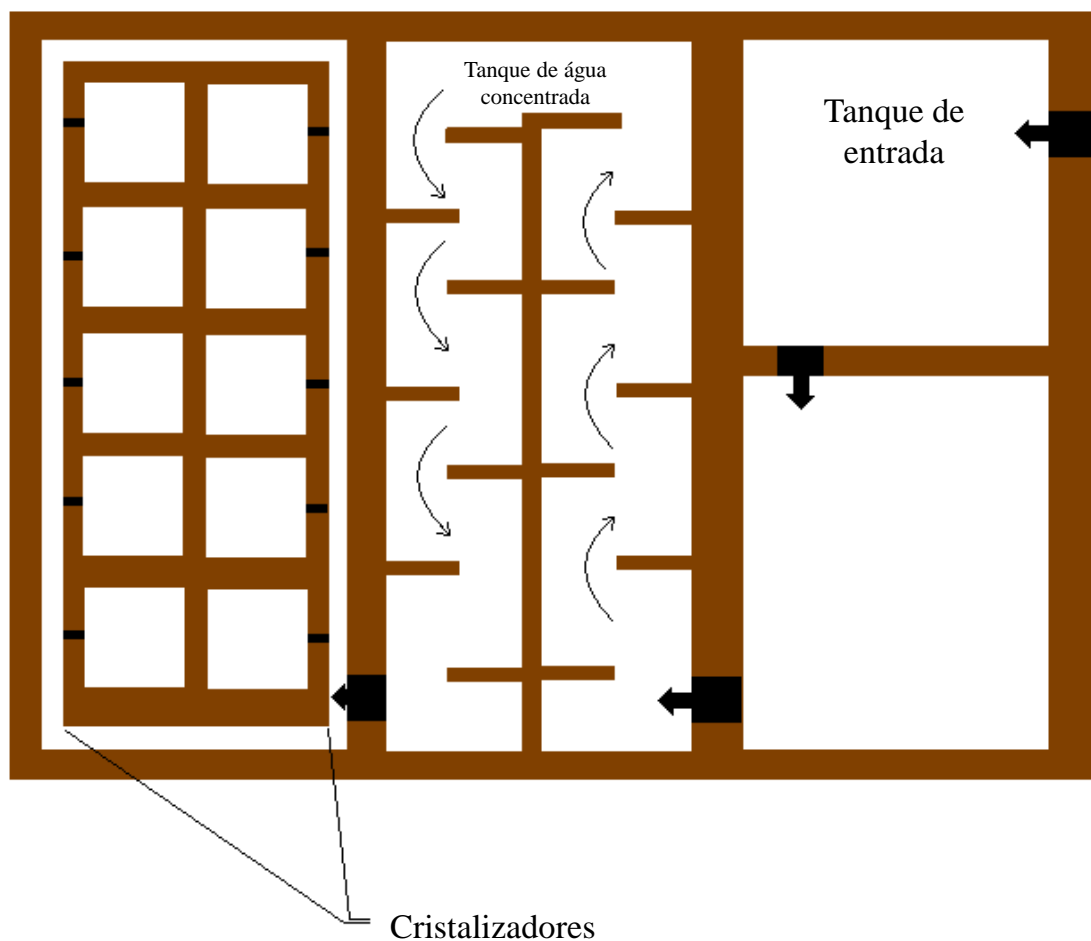


Figura 1 – Representação esquemática de uma salina marinha [1].

As salinas encontram-se normalmente localizadas em estuários, zona onde ocorre a transição entre o rio e o mar, podendo também estar localizadas em zonas mais interiores, próximas de zonas costeiras, onde a água emerge espontaneamente. Em Portugal, as

principais zonas de produção de sal marinho são Aveiro, Figueira da Foz, Alcochete, Ria Formosa e Castro Marim. O sal pode também ser explorado em minas terrestres, sendo o mineral extraído desses locais denominado de sal-gema ou halita (Figura 2). A exploração mineira de sal tem levado ao decréscimo da produção de sal marinho, apesar de este ainda ser produzido em alguns locais.



Figura 2 – Sal-gema [2].

O sal, apesar de ter de apresentar 90% de NaCl, não é apenas composto por NaCl, mas também por matéria orgânica, outros sais e metais. A presença destes compostos na água de salina, influenciada pela localização geográfica e pelos organismos presentes, leva a que ao cristalizar o sal apresente diferentes colorações, variando entre uma coloração branco-translúcido e o preto (Figura 3).



Figura 3 – Diversas colorações que o sal pode apresentar [3].

Nos ambientes que envolvem as salinas é possível encontrar diversos organismos, tais como algas, microalgas, fitoplâncton, invertebrados marinhos ou bactérias [4,5]. A presença destes organismos que vivem em condições extremas de salinidade (organismos

halófitos), nos quais se incluem plantas [6,7], microalgas [8,9] e comunidades bacterianas [10–12], leva a que neste mineral estejam presentes diversos compostos orgânicos, estando estes compostos presentes devido à lise celular, apoptose ou exsudação [13,14]. A localização geográfica da salina é também um fator importante para a sua composição em matéria orgânica, uma vez que o tipo de vegetação, animais e algas que se encontra difere entre os locais, levando assim a diferentes compostos. A atividade humana é também um fator que influencia a composição da matéria orgânica, pois atividades como a pesca, tráfego de barcos e proximidade de indústria leva a que haja a deposição de matéria orgânica nas águas de salina e, conseqüentemente, no sal.

Os polissacarídeos sulfatados, péptidos, ácidos gordos, compostos fenólicos, vitaminas e minerais fazem parte dos compostos que podem estar presentes no sal e águas de salina [15], destacando-se os polissacarídeos sulfatados, uma vez que são bastante apreciados devido tanto às suas propriedades reológicas como aos seus efeitos biológicos [16], tendo já sido descrita a sua presença em sal marinho [17].

1.2. Polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados podem ser compostos por diferentes monossacarídeos, sendo as substituições com ésteres de sulfato uma característica comum. Quando de origem marinha, estes compostos são produzidos maioritariamente por algas, embora possam também ser encontrados em mamíferos e pequenos invertebrados, variando a estrutura do polissacarídeo de acordo com a espécie [16].

As algas marinhas podem ser divididas em três grandes grupos: algas vermelhas (*Rhodophyceae*), castanhas (*Phaeophyceae*) e verdes (*Chlorophyceae*), sendo a classificação feita de acordo com os seus pigmentos fotossintéticos. Estas algas diferem também no tipo de material de reserva que produzem e no tipo de polissacarídeos da parede celular [18]. As algas marinhas produzem uma grande variedade de polissacarídeos, sendo galactanas, fucoidanas e ramnanas os polissacarídeos mais importantes [19]. Os principais polissacarídeos sulfatados encontram-se resumidos na tabela 1, sendo as algas vermelhas responsáveis pela produção das galactanas sulfatadas, podendo ser carragenanas ou agaranas, enquanto as algas castanhas produzem fucoidanas e as algas verdes ramnanas, denominadas de ulvanas [16].

Tabela 1 – Tabela resumo dos polissacarídeos sulfatados de origem marinha.

Tipo de polissacarídeo	Resíduos predominantes	Local de sulfatação predominante	Efeitos biológicos
Carragenanas	($\alpha 1 \rightarrow 3$)- ou ($\beta 1 \rightarrow 4$)-D-Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$)-3,6-anidro-D-Gal	C-2, C-4, C-6	Anticoagulante [20–22] Antioxidante [23,24] Antitrombótico [25,26] Antiviral [27–29] Antitumoral [40–43] Imunoestimulador [34–36]
Agaranas	($\alpha 1 \rightarrow 3$)- ou ($\beta 1 \rightarrow 4$)-D-Gal ($\alpha 1 \rightarrow 3$)- ou ($\beta 1 \rightarrow 4$)-L-Gal ($\beta 1 \rightarrow 4$)-3,6-anidro-D-Gal	C-2, C-6	Antioxidante [37] Antitumoral [38] Antiviral [39,40] Anticoagulante [41–43]
Fucoidanas	($\alpha 1 \rightarrow 3$)- ou ($\beta 1 \rightarrow 4$)-L-Fuc	C-2, C-4	Anticoagulante [44–46] Antiangiogénico [44,47] Antitumoral [48–51] Antiviral [52–55] Antioxidante [56] Antitrombótica [57] Anti-inflamatório [58]
Ulvanas	($\alpha 1 \rightarrow 4$)- ou ($\beta 1 \rightarrow 4$)-L-Rha ($\alpha 1 \rightarrow 4$)- ou ($\beta 1 \rightarrow 4$)-D-Xyl ($\alpha 1 \rightarrow 4$)- ou ($\beta 1 \rightarrow 4$)-D-GlcA ($\alpha 1 \rightarrow 4$)- ou ($\beta 1 \rightarrow 4$)-L-IdoA	C-2, C-3	Imunoestimulador [59] Anti-hiperlipidémica [60] Anticoagulante [61] Antioxidante [62–65] Antitumoral [62] Antiviral [66–68]

1.2.1 – Carragenanas

As carragenanas são polissacarídeos sulfatados, obtidas principalmente de algumas espécies de algas vermelhas [69]. Esta família de polissacarídeos apresenta elevado valor comercial, uma vez que são utilizadas na indústria alimentar pelo seu poder gelificante e emulsionante [70]. Estes compostos são solúveis em água, formando soluções aquosas de elevada viscosidade, dependente da concentração, temperatura e presença de outros solutos, bem como do tipo de carragenana e peso molecular [71]. A viscosidade aumenta de forma quase exponencial com o aumento da concentração, diminuindo com o aumento da temperatura.

1.2.1.1. - Estrutura

As carragenanas são galactanas sulfatadas, com uma massa molecular média acima de 100 kDa, sendo 15 a 40% dessa massa correspondente a ésteres de sulfato. Na sua estrutura podemos encontrar dois dissacarídeos repetitivos (Figura 4), consistindo o primeiro

em resíduos alternados de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose (3,6-AnGal), em ligação ($\beta 1 \rightarrow 4$), e o segundo apenas por D-galactose, em ligação ($\alpha 1 \rightarrow 3$) ou ($\beta 1 \rightarrow 4$). Estes dissacarídeos são classificados em vários grupos (Figura 4) [69], sendo esta classificação feita de acordo com a sua solubilidade em soluções aquosas de cloreto de potássio [72], posição e grau de sulfatação e a presença ou não de resíduos de 3,6-AnGal [73]. As carragenanas do tipo κ apresentam substituições com éster de sulfato em C4 (25 e 30%) e um conteúdo em 3,6-AnGal de 28 a 35%, enquanto as do tipo ι apresentam entre 28 a 30% de éster de sulfato, presentes em C2 e C4 e um conteúdo entre 25 a 30% de 3,6-AnGal. As λ carragenanas apresentam um maior grau de sulfatação, entre 32 e 39% nas posições C2 e C6, embora não apresentem qualquer resíduo de 3,6-AnGal [69,72], e as μ -carragenanas caracterizam-se por apresentar aproximadamente 30% de ésteres de sulfato em C2, C4 ou C6, e 35 a 45% de 3,6-AnGal [74,75].

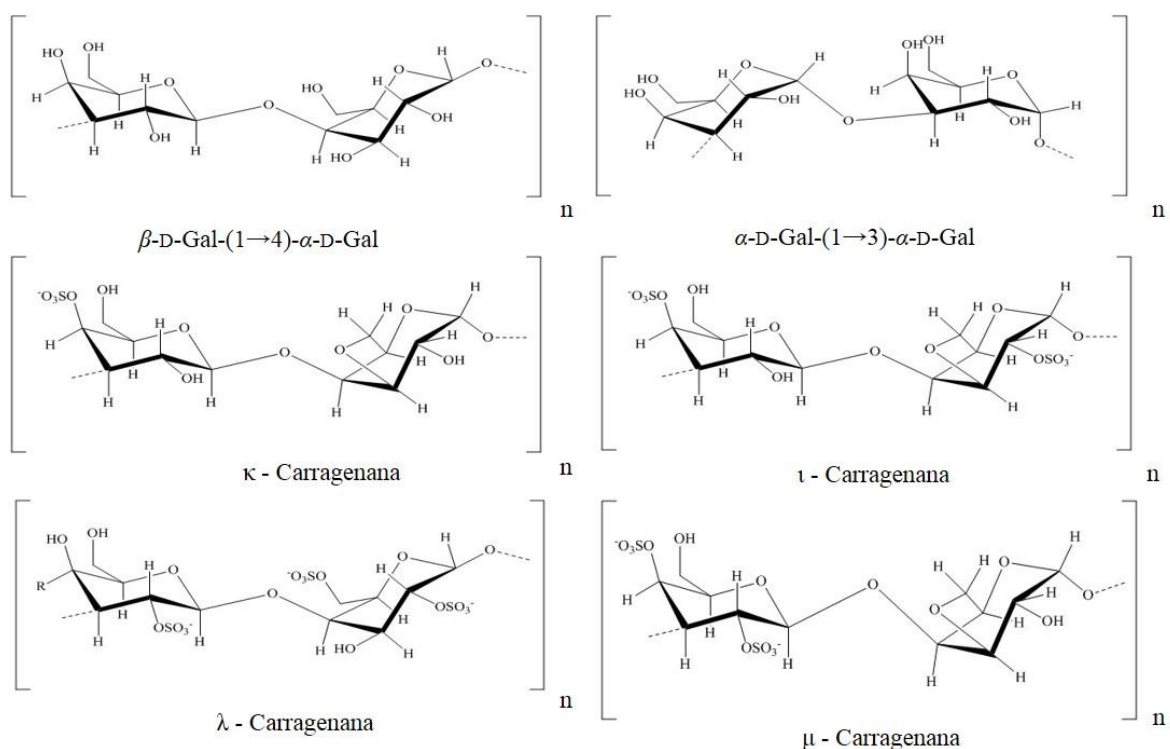


Figura 4 - Diferentes tipos de carragenanas provenientes de algas vermelhas.

As propriedades reológicas das carragenanas são influenciadas pelo seu conteúdo em 3,6-AnGal, uma vez que elevados conteúdos deste resíduo levam a uma maior capacidade gelificante. Por outro lado, elevados níveis de éster de sulfato traduzem-se numa menor

temperatura solubilidade e menor capacidade gelificante [69]. As carragenanas κ e ι apresentam capacidade para formar géis na presença de íões potássio ou cálcio, devido ao elevado conteúdo de 3,6-AnGal, enquanto as λ -carragenanas não apresentam essa capacidade uma vez que não contêm este tipo de resíduo [76].

1.2.1.2. – Origem

O início da comercialização das carragenanas ocorreu na década de 60, tendo sido estas inicialmente obtidas recorrendo à alga tropical *Kappaphycus alvarezii*, que tem a capacidade de produzir κ -carragenanas, e à alga *Eucheuma denticulatum*, que produz ι -carragenanas. Outras espécies, tais como as do género *Gigartina* ou *Chondrus*, levam à produção de carragenanas de outros tipos [77]. As algas da ordem das *Gigartinales* foram também amplamente exploradas, devido à sua disponibilidade na natureza, sendo a fonte maioritária dos últimos 30 anos a espécie *Chondrus crispus*, cultivadas no Canadá e na França, e das quais é possível obter κ - e λ -carragenanas, dependendo do seu estágio de maturação. Atualmente, a produção de κ - e ι -carragenanas é novamente dominada pelas algas *Kappaphycus alvarezii*, cultivadas nas Filipinas e Indonésia [78].

O estágio de maturação leva à produção de diferentes carragenanas por parte das algas, assim como o ambiente do local de cultivo. Exemplo disso são as algas da espécie *Eucheuma isiforme* que, quando produzidas na Nicarágua ou no México, vão originar diferentes proporções de 3,6-AnGal, assim como diferentes posições nas substituições com ésteres de sulfato [79–81]. Apesar de ambas as origens apresentarem Gal-4-sulfato e 3,6-AnGal-2-sulfato (substituição característica de ι -carragenanas), quando esta alga é produzida na Nicarágua foi observada a presença de galactose-6-sulfato [79], tendo-se comprovado a presença de galactose-2-sulfato quando o cultivo é realizado no México [81]. Relativamente ao conteúdo de sulfato, ambas as origens apresentam percentagens equivalentes, 32% quando cultivadas na Nicarágua e 31% no México, embora se verifiquem diferenças na percentagem de 3,6-AnGal, 19% na Nicarágua e 27% no México [79]. Apesar de se verificarem diferenças associadas ao local de cultivo, as algas da espécie *Eucheuma isiforme* foram identificadas como uma fonte promissora de ι -carragenanas [79–81].

Também os polissacarídeos da alga da espécie *Sarconema scinaoides* foram caracterizados [82], tendo-se concluído que estes eram constituídos maioritariamente por

galactose e 3,6-AnGal, e pequenas quantidades de resíduos de xilose. Foi também determinado que a galactose está ligada em (1→3) e (1→4) (Figura 5) quando não apresenta substituições. A galactose pode estar substituída por ésteres de sulfato em C-6 e C4, com o resíduo de galactose em ligação (1→3). Os resíduos de 3,6-AnGal encontram-se sempre em ligação (1→4) podem encontrar-se sulfatados em C-2. Os polissacarídeos obtidos de *Sarconema scinaoides* pertencem assim ao grupo das ι-carragenanas, devido à presença de substituintes característicos (sulfatação em C-2 dos resíduos de 3,6-AnGal) [82].

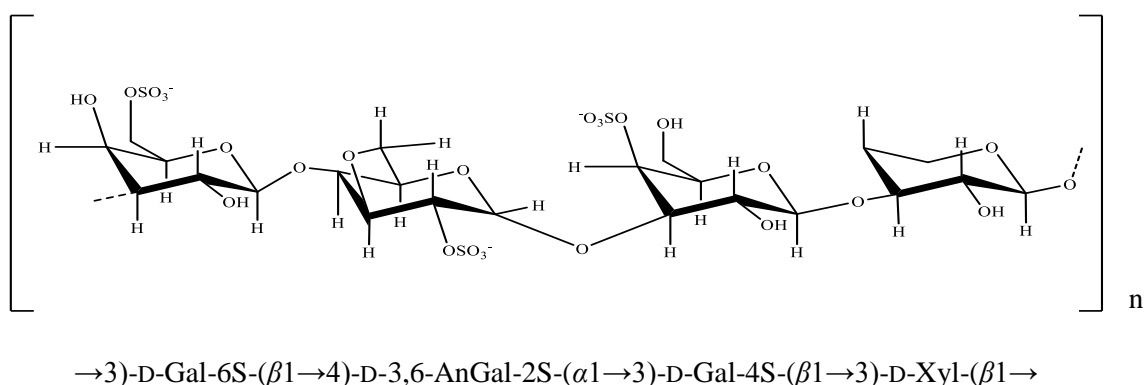


Figura 5 – Carragenanas provenientes de *Sarconema scinaoides*.

As carragenanas da alga *Halymenia floresii* pertencem à família das λ-carragenanas, uma vez que estas apresentavam baixos conteúdos de 3,6-AnGal (cerca de 2%), elevados níveis de sulfato (cerca de 42%), sendo solúveis em soluções de KCl com concentrações de 0,3 M [78]. Foi ainda determinado que estes polissacarídeos não apresentam capacidade gelificante, e que estão dissulfatados em C-6 e C-2 na galactose (Figura 6) [78].

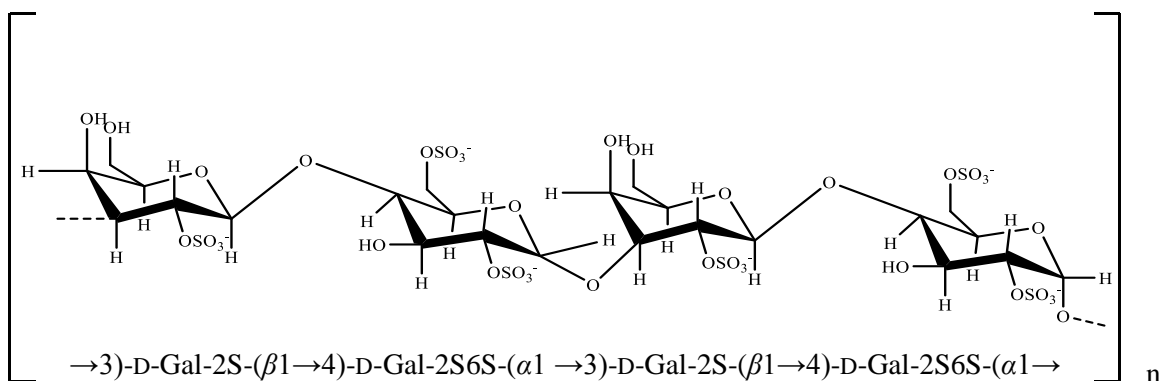


Figura 6- Carragenanas provenientes de *Halymenia floresii*.

1.2.1.3. – Efeitos biológicos

Apesar das carragenanas serem utilizadas na indústria alimentar como texturizantes [21], estes polissacarídeos sulfatados têm demonstrado potencial para outras aplicações devido às suas atividades biológicas e fisiológicas, tais como anticoagulante [20–22], antioxidante [23,24], antitrombótico [25,26], antiviral [27–29], antitumoral [30–33] e imunoestimuladora [34–36]. A concentração em sulfatos e o seu peso molecular influenciam as suas atividades biológicas verificando-se, por exemplo, um aumento da capacidade anticoagulante destes polissacarídeos à medida que se aumenta o grau de sulfatação [83].

As carragenanas possuem capacidade anticoagulante *in vitro*, sendo a maior observada para as λ-carragenanas, estando contudo abaixo da heparina [21]. Também possuem capacidade para a indução de edemas, apresentando κ-carragenana maior atividade do que a τ e λ. Por outro lado, as carragenanas originam uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela acumulação de fluido, verificando-se maior concentração para as λ-carragenanas. As carragenanas induzem a pleurisia e levam ao aumento do edema, através de ativação da inflamação, reduzindo a coagulação [21].

As λ-, κ- e ι-carragenanas apresentam capacidade antioxidante [84], nomeadamente no sequestro do radical superóxido, em que as λ-carragenanas apresentaram a menor capacidade das três. O grau de sulfatação está diretamente relacionado com a atividade oxidante, em que uma maior sulfatação origina polímeros com maior atividade [85]. O teste do sequestro do radical hidroxilo foi também realizado para avaliar a capacidade antioxidante [84], indicando os resultados que as carragenanas testadas apresentam

capacidade moderada para sequestrar este radical, sendo as ι -carragenanas as que apresentam a maior capacidade, seguindo-se as λ -carragenanas e por fim as κ -carragenanas.

Num estudo realizado por Yuan *et al* [35] foi testada a capacidade antitumoral, o efeito imunoestimulatório, o estímulo à proliferação de linfócitos e a atividade das células NK nos oligossacarídeos provenientes de carragenanas. Estes autores concluíram que estes compostos apresentam efeitos antitumorais bem como atividade imunomodulatória. Os oligossacarídeos inibiram também significativamente o crescimento de sarcomas em ratinhos com tumores, em doses médias e elevadas, podendo também aumentar significativamente o timo e o baço. Verificou-se também um estímulo à produção de linfócitos, ativação de células NK e fagocitose mediada por macrófagos.

1.2.2. – Agaranas

As agaranas, tal como as carragenanas, são extraídas de algas vermelhas, diferindo na série dos seus dissacarídeos base, o que originam diferentes propriedades físico-químicas. A capacidade gelificante das agaranas é superior quando comparada com as carragenanas. Dentro dos elementos que contribuem para uma maior capacidade gelificante podemos encontrar os elevados níveis de 3,6-anidro-galactose, que é importante para a estabilidade dos géis formados, assim como o menor conteúdo em ésteres de sulfato. As duplas metilações nos resíduos de galactose são também um fator importante para esta característica, uma vez que aumentam a temperatura de fusão do gel [86]. Devido à sua elevada capacidade gelificante, as agaranas têm sido alvo de diversas indústrias, tais como alimentar ou farmacêutica, em processos que necessitem de gelificação ou estabilização [86,87].

1.2.2.1. – Estrutura

As agaranas diferem das carragenanas por apresentarem um resíduo de série diferente, ou seja, enquanto as carragenanas apresentam sempre o enantiómero D, as agaranas apresentam o enantiómero D e L alternado [88]. Os dissacarídeos base repetitivos (Figura 7) destes polissacarídeos sulfatados caracterizam-se por apresentar resíduos alternados de β -D-galactose em ligação glicosídica (1 \rightarrow 4), com resíduos de 3,6-anidro- α -L-galactose ou α -L-galactose. Quando as ligações glicosídicas são apenas entre resíduos de

galactose, estas podem também ser (1→3) [89]. Estes dissacarídeos contêm diversos grupos substituintes na cadeia linear, tais como grupos metilo, éster de sulfato, piruvato ou resíduos de β-D-xilose [90]. Apesar de todos os substituintes poderem estar presentes, contrariamente às substituições típicas das carragenanas, as agaranas são pobres em ésteres de sulfato, sendo ricas em grupos metilo ou acetal piruvato [90]. A variabilidade na estrutura química destas galactanas, principalmente o conteúdo em 3,6-anidro-galactose e o teor e posição da sulfatação é determinante para as suas propriedades físicas e biológicas [88].

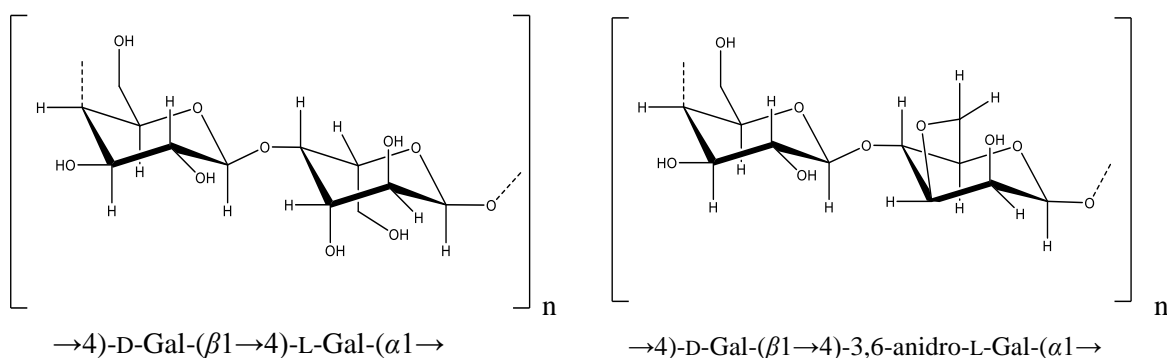


Figura 7 - Dissacarídeos repetitivos de agaranas.

1.2.2.2. – Origem

A família *Rhodomelaceae*, na qual se incluiu um largo espectro de algas, tais como as espécies *Odonthalia* sp., *Polysiphonia* sp., *Rhodomela* sp., *Chondria* sp., *Dasyclonium* sp., *Lenormandia* sp., *Osmundaria* sp. e *Bryocladia* sp., caracteriza-se pela capacidade que possui para produzir polissacarídeos sulfatados, entre os quais se destaca a produção de carragenanas e agaranas [89]. Outra possível fonte de agaranas é o género de algas *Laurencia* sp., na qual se destacam as espécies *L. thyrsofera*, *L. nipponica*, *L. undulata*, *L. coronopus*, *L. pinnatifida*, *L. gemmifera* e *L. flexilis*[19].

Miller *et al.* [91] analisaram a agarana extraída de *Laurencia thyrsofera* (Figura 8) e concluíram que esta possui resíduos β-D-galactose que podem conter grupos sulfato em C-2 e C-6. Foi também descrita a presença dos resíduos 2-O-metil-α-L-galactose e xilose, revelando assim a diversidade estrutural que está inerente a este tipo de polissacarídeos, mesmo em apenas um organismo.

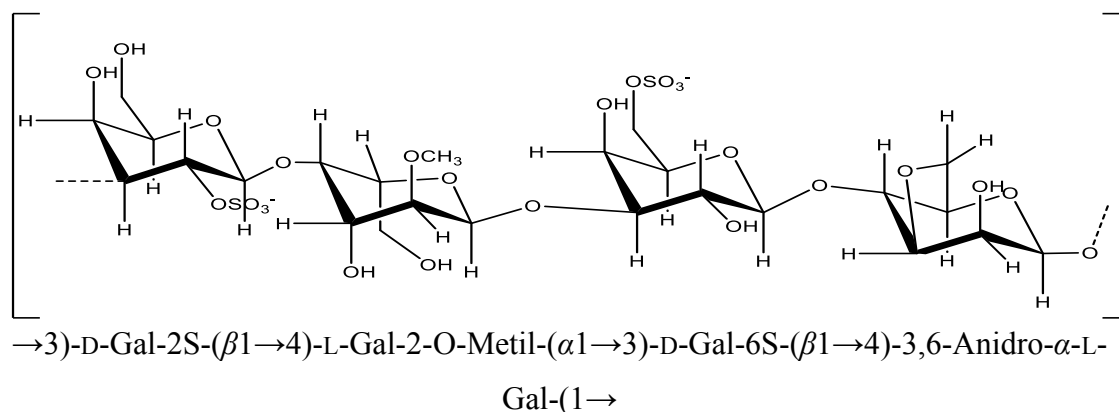


Figura 8 - Estrutura repetitiva linear da agarana da alga *Laurencia thyrsoifera*.

Uma agarana bastante estudada é a porfirana, obtida pela extração de algas vermelhas da espécie *Porphyra sp.*, tais como a *Porphyra capensis* [92] ou *Porphyra haitanensis* [93,94]. Estas agaranas (Figura 9) apresentam normalmente uma cadeia linear alternando entre resíduos de β-D-galactose em ligação (1→3) e resíduos de α-L-galactose-6-sulfato ou 3,6-anidro-α-L-galactose em ligação (1→4) [92,95]. As suas cadeias lineares podem apresentar diferentes substituições, tais como ésteres de sulfato, grupos metilo ou resíduos de xilose, que contribuem para a sua diversidade estrutural [94].

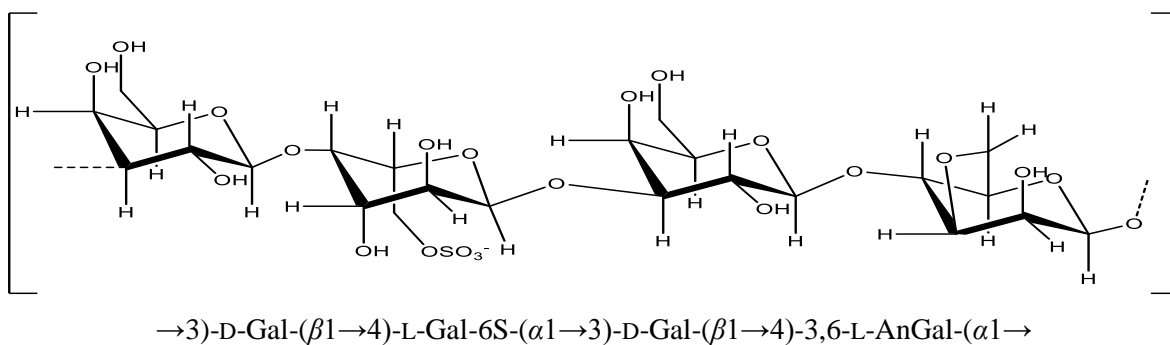


Figura 9 – Estrutura repetitiva linear da agarana das algas do género *Porphyra sp.*

As agaranas de *Euptilota formosissima*, *Ceramium boydenii* e *Neoptilota asplenioides* apresentam um elevado grau de metilação devido à presença de unidades de 6-O-metil-D-galactose. A espécie *Neoptilota asplenioides* tem também, para além do elevado

grau de metilação, 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose. A espécie *Ceramium rubrum* possui uma agarana com resíduos de 6-*O*-metil-D-galactose, 2-*O*-metil-L-galactose, 3,6-anidro-L-galactose e 3,6-anidro-2-*O*-metil-L-galactose [90].

1.2.2.3. – Efeitos biológicos

A capacidade antioxidante das agaranas extraídas da espécie *Gracilaria birdiae* foi avaliada num estudo realizado por Souza *et al.* [37], tendo estes concluído que estes compostos apresentam elevada capacidade para sequestrar o radical DPPH, apesar de nenhuma das amostras apresentar atividade mais elevada do que a de BHT, um antioxidante de referência. A capacidade das agaranas para sequestrar o radical hidroxilo aumenta à medida que se aumenta a sua concentração [37]. A capacidade antioxidante destes está relacionada com algumas características específicas, tais como a presença de um ou mais grupos OSO_3^- ou a ausência de grupos OH^- (na forma de 3,6-AnGal) na molécula, levando a presença de grupos sulfato ao aumento significativo na capacidade para remover radicais OH^- [96,97].

A capacidade antioxidante das agaranas foi também avaliada *in vivo*, tendo-se concluído que a administração de agaranas, através de injeção em ratinhos e em doses elevadas (400 mg/kg), leva ao mesmo efeito ou superior à adição de ácido ascórbico, com uma concentração de 200 mg/kg. Foi também possível concluir que a adição de agaranas leva a um aumento da proteção contra a oxidação, através do estímulo à produção de enzimas especializadas na proteção antioxidante (superóxido dismutase e glutathione peroxidase), culminando num aumento da capacidade antioxidante total, sendo os efeitos observados dependentes da dose [98].

O efeito antitumoral das agaranas foi também testado, num trabalho realizado por Kown *et al.* [38], tendo os autores concluído que as agaranas apresentam capacidade antiproliferativa em linhagens celulares de carcinoma gástrico humano AGS, sendo a inibição no crescimento dependente da dose. Foi também mostrado que a apoptose induzida pelos polissacarídeos esta associada à ativação de caspases, proteínas envolvidas no processo de morte celular, havendo um aumento da clivagem proteolítica das caspases-3 e 9. Os níveis de algumas moléculas pro-apoptóticas e anti-apoptóticas foram também analisados, concluindo-se que os seus níveis estavam bem correlacionados com a apoptose induzida

pelas agaranas em células humanas. Este estudo permitiu ainda concluir que o tratamento com polissacarídeos sulfatados reduz a ativação dos recetores IGF-I e a sinalização mediada por estes recetores, levando à apoptose.

Outras atividades biológicas das agaranas foram comprovadas, tais como a atividade antiviral [39,40] e atividade anticoagulante [41–43].

1.2.3. – Fucoïdanas

As fucoïdanas pertencem à família de polissacarídeos sulfatados que se caracteriza por ser rica em fucose, podendo ser encontrados nas paredes celulares fibrilares e nos espaços intercelulares de algas castanhas, tais como as algas do género *Fucus*. A sua viscoelasticidade mantém-se para várias gamas de pH, sendo estas moléculas também estáveis em soluções salinas, demonstrando assim que estes têm potencial para serem utilizados como estabilizantes, espessantes e como agente retentor de água em alimentos, cosméticos e outras indústrias [99].

1.2.3.1. – Estrutura

A estrutura das fucoïdanas (Figura 10) consiste numa cadeia linear de resíduos de α -L-fucose em ligação (1→3) e (1→4), podendo estar organizados em cadeias de L-fucose exclusivamente em ligação (1→3), ou alternando entre resíduos em ligação (1→3) e (1→4). Os resíduos de L-fucose podem estar substituídos com ésteres de sulfato ($-\text{OSO}_3^-$) em C-2 ou C-4, apresentando raramente sulfatações em C-3. Podem ainda ser encontrados resíduos simples de L-fucose ou pequenas cadeias de fucose em ramificações e, caso estas estejam presentes, encontram-se ligados à α -L-fucose da cadeia principal em C-4 [100]. A enorme variedade de estruturas que se podem encontrar nas fucoïdanas não se limita a diferentes substituições com sulfato ou grupos acetilo, mas também a composição em monossacarídeos da cadeia principal contribui para a sua diversidade. Na sua estrutura podem estar presentes resíduos de galactose, manose, xilose, glucose e/ou ácido glucurónico, embora sejam normalmente componentes minoritários [101].

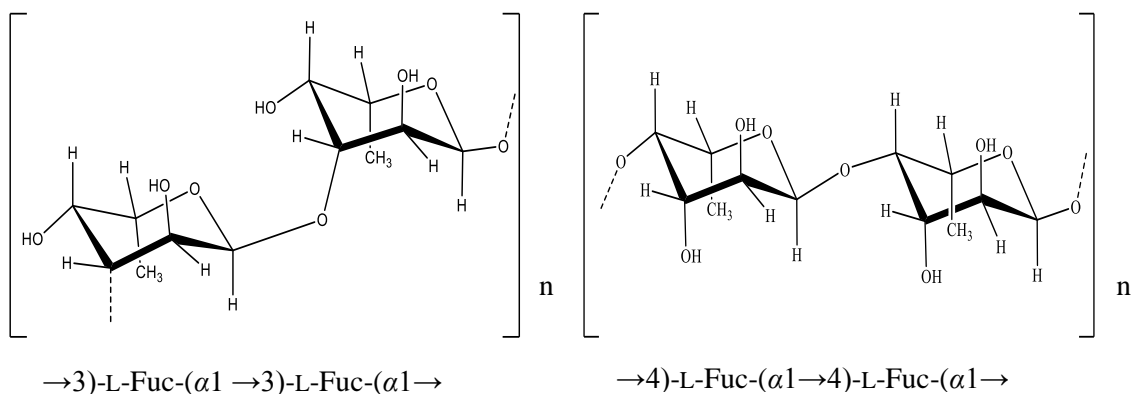


Figura 10 - Dissacarídeos repetitivos de fucoidanas.

1.2.3.2. – Origem

As fucoidanas de *F. vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum* (Figura 11) apresentam um dissacarídeo predominante, contendo ésteres de sulfato em C-2 dos resíduos de fucose em ligação (1→3) e em C-2 e C-3 dos resíduos de fucose em ligação (1→4) [102].

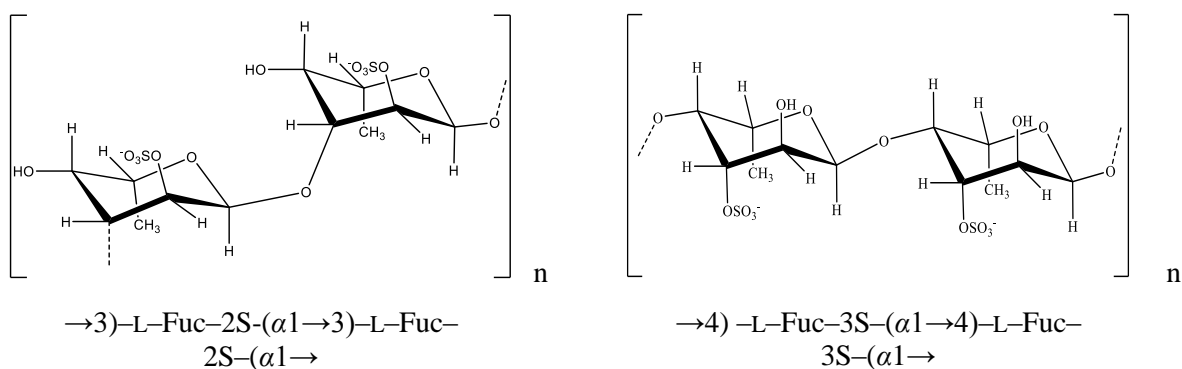


Figura 11 - Dissacarídeos repetitivos de fucoidanas sulfatados em C-2 e C-3.

Nos polissacarídeos provenientes de *F. vesiculosus* foi ainda observada a presença de fucose 2,4-di-sulfato bem como de fucose 2,3-di-sulfato (Figura 12) [103].

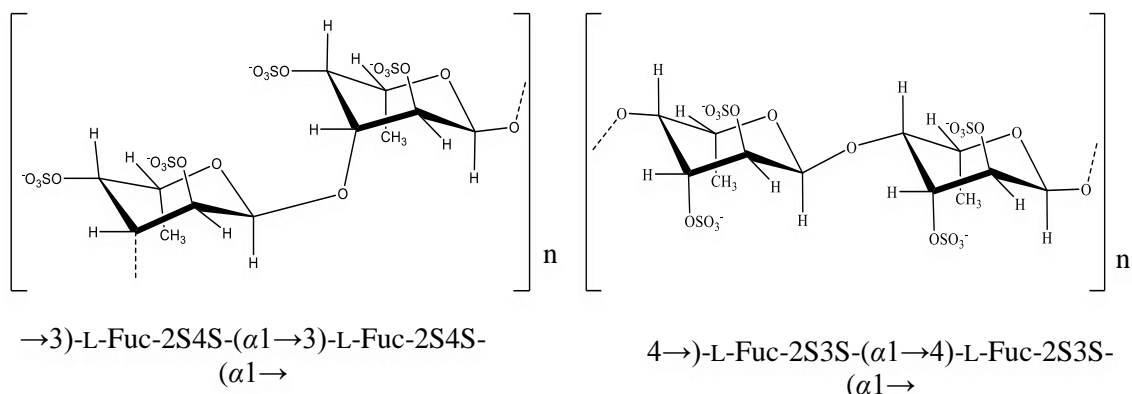


Figura 12 - Dissacarídeos repetitivos de fucoidanas di-sulfatadas em C-2/C-4 e C-2/C-3 respectivamente.

Os polissacarídeos sulfatados de *F. evanescens* apresentam frações oligossacarídicas com e sem substituições de sulfato, consistindo principalmente em resíduos de fucose em ligação $(\alpha 1\rightarrow 3)$, esterificados com sulfato em C-2 [104]. Esta análise revelou ainda a presença de compostos minoritários, consistindo em fuco-oligossacarídeos mono-sulfatados, contendo resíduos de xilose e galactose, sulfatados tanto em C-2- como em C-4, em ligação $(1\rightarrow 3)$ (Figura 13). Pode também conter ácido glucurónico como parte dos fuco-oligossacarídeos não sulfatados [104].

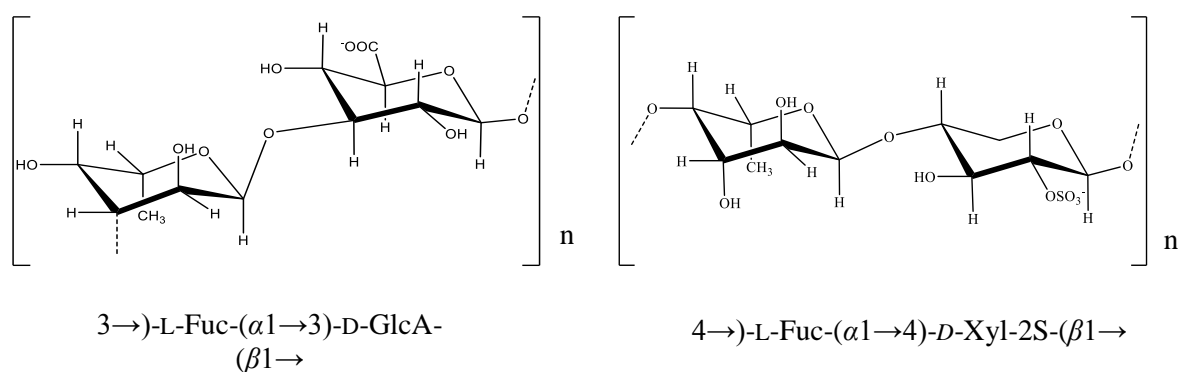


Figura 13 - Dissacarídeos repetitivos de fucoidanas substituídas com Ácido glucurónico e Xilose.

Devido às diferenças estruturais descritas e às diferenças que se podem obter devido aos diferentes métodos de extração e condições utilizadas, as fucoidanas foram classificadas em dois grupos. No primeiro grupo incluem-se os polissacarídeos em que as cadeias

principais são compostas por resíduos de L-fucose em ligação (1→3), podendo ser extraídos de *Laminaria saccharina*, *L. digitata*, *Anelipus japonicus*, *Cladosiphon* e *Chorda filum*. O segundo grupo caracteriza-se por uma cadeia principal composta por resíduos de L-fucose, com ligações alternadas entre (1→3) e (1→4), podendo ser isoladas de *Ascophyllum nodosum* e outras espécies de *Fucus* [105].

1.2.3.3. – Efeitos biológicos

Vários autores avaliaram os efeitos biológicos das fucoidanas, tais como o efeito anticoagulante [44–46], antiangiogénico [44,47], antitumoral [48–51] e antiviral [52–55] e capacidade antioxidante [48,56,106–109]. A capacidade para sequestrar o radical DPPH foi avaliada [56], tendo-se verificando-se uma elevada capacidade de eliminação por parte das fucoidanas, para doses de 1 mg/mL (61%), quando comparado com o controlo BHA (hidroxianisol de butilo) (100%). Uma vez que foram utilizadas frações purificadas do polissacarídeo, este estudo levou a concluir que a capacidade observada se deve de facto às fucoidanas e não a potenciais contaminantes (como proteínas ou compostos fenólicos) que estejam presentes na amostra [56]. Costa *et al.* [110] avaliaram a capacidade de fucoidanas para sequestrar os radicais hidroxilo e superóxido, sendo os polissacarídeos extraídos de diferentes algas castanhas. Os resultados obtidos demonstram que todos os polissacarídeos sulfatados testados apresentam capacidade antioxidante, sendo os extraídos da *Phaeophyta sargassum filipendul* os que apresentam o maior valor para este parâmetro e os da *Spatoglossum schroederi* os que apresentam a menor capacidade. [110]. A capacidade antioxidante é dependente da estrutura do polissacarídeo, embora os autores não tenham determinado de que modo a estrutura influencia esta capacidade.

A capacidade antitrombótica das fucoidanas foi também testada *in vivo* [57], com polissacarídeos extraídos da alga castanha *Sargassum vulgare*, seguindo-se purificação. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que as fucoidanas extraídas de *Sargassum vulgare* apresentam capacidade antitrombótica, apesar de esta apenas ser considerável para concentrações elevadas, cerca de dez vezes superiores à concentração de heparina.

A atividade anti-inflamatória destes polissacarídeos sulfatados foi testada *in vivo*, com polissacarídeos extraídos da alga castanha *Lobophora variegata*, tendo-se concluído

que as fucoïdanas reduzem o edema causado por diversos agentes edematogênicos, levando também à redução do estímulo inflamatório. O tratamento com estes polissacarídeos reduz ainda a permeabilidade vascular, a migração de leucócitos e a concentração de NO nos exudatos recolhidos [58]. O efeito anti-inflamatório de fucoïdanas extraídas de diversas espécies de algas foi também testado [111], concluindo-se que os polissacarídeos com maior capacidade inibitória foram extraídos de *L. saccharina* e *F. evanescens*, (inibição de mais de 90%, quando comparado com uma solução salina, o controlo negativo). Os polissacarídeos com menor capacidade para inibir foram obtidos de *F. distichus* e *F. spiralis*, inibindo aproximadamente 60%.

1.2.4. – Ulvanas

As algas verdes são ainda pouco utilizadas comercialmente, apesar de serem utilizadas na alimentação em alguns países há vários séculos. A descoberta de um importante constituinte destas algas, as ulvanas, aumentou o interesse neste tipo de algas [18].

As ulvanas são um dos principais polissacarídeos produzidos pelas algas verdes, das quais se destaca o género *Ulva*, sendo esta uma potencial fonte a ser explorada. Estudos realizados com este polissacarídeo demonstraram que este apresenta diversas propriedades, o que o torna num polissacarídeo com potencial para ser utilizado em diversas aplicações [112–115]. Uma das características únicas das ulvanas é a presença de ramnose sulfatada e ácido idurónico [116]. As ulvanas são também capazes de formar géis na presença de ácido bórico, numa reação mediada por íons de cálcio, indicando que estas estão presentes na parede celular das algas verdes na forma de gel [117]. As suas características peculiares, tais como a sua capacidade para realizar trocas iónicas e características gelificantes, são promissoras para a sua utilização em produtos nos quais seja necessário complexar metais. As ulvanas apresentam também potencial biológico para serem aplicados nas indústrias agrícola, alimentar e farmacêutica [118]. As algas verdes estão facilmente disponíveis em águas costeiras eutrofizadas ou em cultura [119].

1.2.4.1. - Estrutura

As ulvanas são constituídas por uma cadeia principal composta maioritariamente por resíduos de ramnose, xilose e ácidos glucurónico e idurónico, distribuídos em dissacarídeos repetitivos. Os dois principais dissacarídeos (Figura 14) são os ácidos ulvanobiurónicos do tipo A e B, sendo o tipo A constituído por resíduos de ácido β -D-glucurónico e resíduos de α -L-ramnose em ligação (1 \rightarrow 4). O tipo B consiste em resíduos de ácido α -L-idurónico e resíduos de α -L-ramnose também em ligação (1 \rightarrow 4) [116,119].

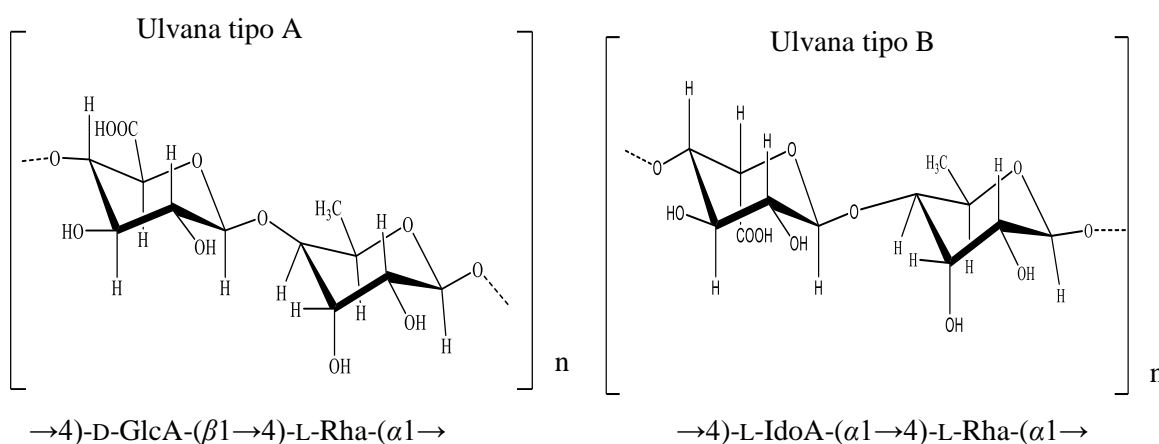


Figura 14 - Dissacarídeos repetitivos de Ulvanas: Ulvanas tipo A e Ulvanas Tipo B.

A quantidade de cada monossacarídeo e o arranjo destes dentro dos polissacarídeos pode variar de acordo com vários fatores, tais como a distribuição geográfica e maturação da espécie, as condições ambientais e a sazonalidade, resultando numa grande variedade de estruturas de ulvanas [18]. A análise estrutural destas estruturas é dificultada pela presença de ácido aldobiorónico, resistente a hidrólise ácida, e de ácido idurónico, que apresenta uma natureza lábil, sendo facilmente degradado pelas condições acídicas necessárias à análise de polissacarídeos [120,121]. De forma a minimizar estes efeitos, foram propostos novos métodos que combinam hidrólises ácidas suaves com a degradação enzimática, recorrendo à β -glucuronidase ou a uma mistura de enzimas tais como celulase, xilanase, β -glucosidase, β -glucanase e xilanase [122].

1.2.4.2. - Origem

As ulvanas da alga *Enteromorpha compressa* apresentam grupos sulfato ligados à ramnose na posição C-2 (Figura 15). É possível encontrar ramificações no heteropolissacarídeo, como resíduos de ácido urónico na posição terminal, estando estes ligados à posição C-4 da ramnose [123].

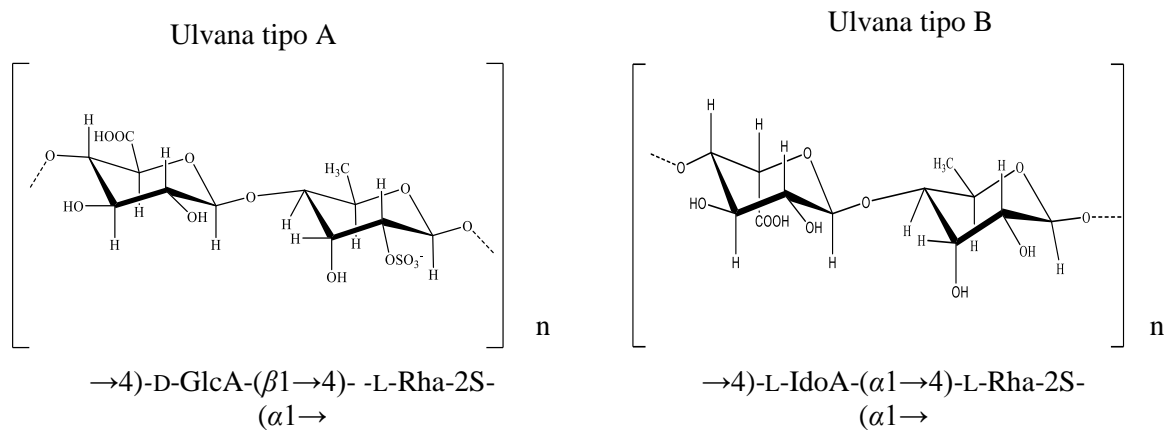


Figura 15 - Dissacarídeo repetitivo de ulvanas monosulfatados.

As ulvanas da espécie *Ulva rigida* [124–126] contêm os grupos sulfato ligados à posição C-2 ou C-3 da ramnose, existindo também evidências da presença de resíduos de sulfato em xilose, sendo essas sulfatações na posição C-2 (Figura 16).

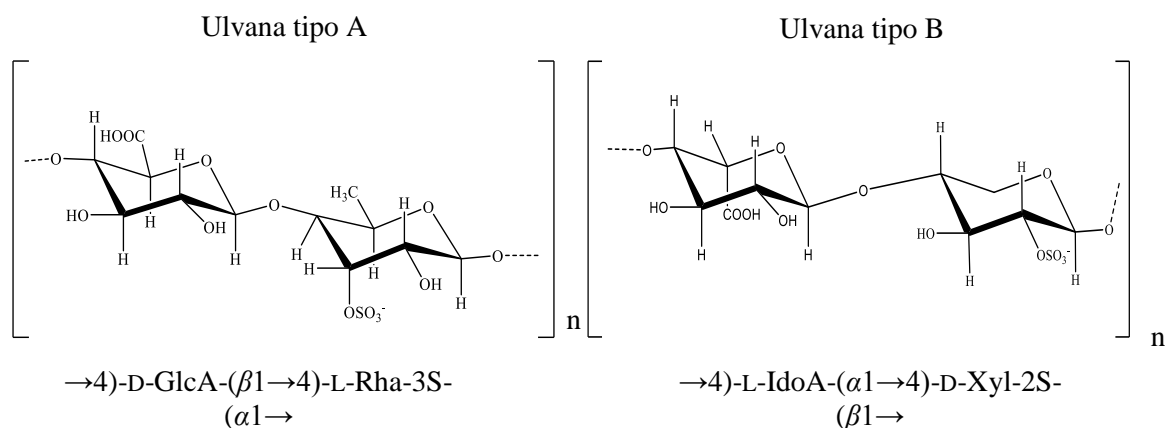


Figura 16 - Dissacarídeo repetitivo de ulvanas monosulfatados e substituídas com xilose.

1.2.4.3. – Efeitos biológicos

O efeito imunoestimulador das ulvanas foi avaliado num trabalho realizado por Leiro *et al.* [59], os quais extraíram os polissacarídeos das algas verdes da espécie *Ulva rígida* e os purificaram. Os autores observaram que a produção de NO no sobrenadante dos macrófagos aumentou consideravelmente quando as células eram incubadas com o polissacarídeo nativo, sendo o aumento dependente da dose. Quando testado o efeito do polissacarídeo dessulfatado, verificou-se que este era inferior ao obtido para o polissacarídeo sem tratamento (cerca de 50 % inferior), indicando estes resultados que a presença de sulfato é um fator importante na capacidade imunomestimuladora. Verificou-se também que o aumento dos níveis de óxido nítrico se deve ao aumento da expressão da enzima NOS-2 (Óxido nítrico sintase), uma vez que se observou o aumento de mRNA de NOS-2 produzidos pelos macrófagos [59]. Observou-se também que a produção de PGE₂ é estimulada pelo polissacarídeo, também dependente da dose. O aumento de PGE₂ deveu-se ao aumento da expressão de COX-2 (Ciclo-oxigenase), enzima responsável pela síntese desta molécula [59].

Também a capacidade anti-hiperlipidémica foi avaliada, num trabalho de Pengzhan *et al.* [60], os quais obtiveram os polissacarídeos sulfatados da alga verde *Ulva pertusa*. Neste estudo foram testadas frações do polissacarídeo bem como o polissacarídeo sem fracionamento, tendo os autores concluído que ambas as dietas levaram ao decréscimo dos índices de gordura no abdómen de ratinhos. A dieta suplementada com o polissacarídeo levou ainda ao decréscimo dos valores séricos de colesterol total e colesterol-LDL, enquanto a suplementação com as frações do polissacarídeo levou ao decréscimo de triacilglicérides séricos e ao aumento da concentração de colesterol-HDL, apesar de se verificar também o aumento das concentrações séricas de colesterol total e colesterol LDL. O aumento que se verificou no volume das fezes e excreção de sais biliares leva a concluir que a diminuição dos valores séricos observados se ficou a dever ao aumento da excreção de colesterol total e colesterol LDL [60].

O efeito anticoagulante das ulvanas foi avaliado num trabalho realizado por Mao *et al.* [61], com polissacarídeos provenientes de *Monostroma nitidum*, tendo sido testadas duas frações que diferiam no peso molecular, grau e posição das sulfatações. Ambas as frações apresentaram atividade anticoagulante, atuando tando sobre a via extrínseca de coagulação,

como pela inibição da atividade da trombina. Entre as duas frações do polissacarídeo foram verificadas diferenças na capacidade anticoagulante, sendo estas explicadas por diferenças estruturais nas frações, uma vez que os fragmentos de menor peso molecular e com maior grau de sulfatação apresentam maior atividade [61]. Estas conclusões foram já descritas por outros autores [127–129], tendo estes identificado o grau de sulfatação e o peso molecular como elementos fundamentais para esta atividade.

Outros efeitos biológicos foram também descritos em ulvanas, tais como a capacidade antioxidante [62–65], a atividade antitumoral [62] e a atividade antiviral [66–68].

1.3. Objetivos do trabalho

Os polissacarídeos sulfatados são compostos bastante valorizados tanto pela indústria alimentar como farmacêutica [70,73,87,99,112,113,118]. Como a sua extração a partir de algas é um processo complexo, é importante encontrar uma fonte rica nestes polissacarídeos de modo a que sejam facilmente obtidos. A libertação destes compostos para o meio aquático leva que haja acumulação, uma vez que são estruturas resistentes à degradação enzimática, sendo provável que, devido à elevada solubilidade das estruturas resultantes, se encontrem em águas de salina e no sal marinho. Assim, este trabalho tem como objetivo a extração e caracterização dos polissacarídeos sulfatados do sal e das águas das salinas, assim como a determinação da sua potencial atividade imunoestimuladora.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção das amostras

As amostras foram recolhidas em setembro de 2013 na salina da Universidade de Aveiro, numa fase em que a recolha do sal já estava terminada. A Figura 17 mostra uma imagem da salina e os locais de recolha das amostras. Esta fotografia foi tirada do GoogleMaps, numa altura em que a produção de sal se encontrava no seu máximo, o que não corresponde à data em que as amostras foram recolhidas para a realização do presente trabalho. Foram recolhidas três amostras: água dos tanques mais próximos da entrada de água no cristalizador; água dos tanques mais afastados da entrada, contendo uma maior concentração em NaCl e sal cristalizado sem qualquer tipo de tratamento, recolhido do monte de sal formado na margem da salina (SAL). As duas amostras de água (10 L de cada) foram concentradas por ebulição, tendo precipitado sal contido nestas águas. O sal precipitado foi separado da água por decantação, originando o precipitado de água de entrada (PAE) e o precipitado de água concentrada (PAC). As águas após foram recolhidas após ebulição, originando as amostras água de entrada (AE) e água concentrada (AC).



Figura 17 – Local de recolha de amostras na salina da universidade de Aveiro [159].

Todas as amostras foram dialisadas contra água destilada, utilizando-se mangas de diálise (Medicell, 12-14 kDa), recolhendo-se o material de elevado peso molecular. No caso do sal sólido e dos precipitados, estes foram colocados dentro da membrana de diálise com uma quantidade mínima de água para remover o ar e eliminar os vértices mais aguçados do sal, que poderiam romper a membrana [17]. As diálises foram realizadas em potes de 10 L, tendo sido colocadas 6 mangas por pote. Para as amostras no estado líquido cada manga tinha um volume de 200 mL, perfazendo um total de 1,2 L por pote, enquanto nas amostras sólidas foram colocados 200 g de sal, com uma massa final de 1,2 kg por pote. O processo de diálise terminou quando a condutividade do dialisado e da água destilada se igualaram. Para o material solúvel, tal equilíbrio surgiu entre 4 e 7 dias e para os precipitados, a diálise estendeu-se por 1 mês, com mudas de água 2 vezes por dia. O material polimérico foi depois concentrado através de um evaporador rotativo, sendo de seguida congelado e liofilizado. As amostras liofilizadas foram armazenadas num exsiccador com pentóxido de fósforo até serem analisadas.

2.2. Análise de açúcares neutros

A determinação de açúcares neutros foi realizada recorrendo a uma hidrólise reductiva, segundo o protocolo proposto por Stevenson *et al.* [130], sendo os monossacarídeos convertidos de seguida em acetados de alditol, através de uma acetilação. Neste tipo de hidrólise os resíduos de monossacarídeos libertados do polissacarídeo devido à hidrólise são simultaneamente reduzidos, impedindo que os mais lábeis sejam degradados pelo ambiente ácido.

Cerca de 1 mg de amostra foi pesada em tubos e foram adicionados 200 µL 3 M de ácido trifluoroacético (TFA) e 50 µL do complexo borano-4-metilmorfolina (MMB) 80 mg/mL. A amostra foi colocada a 80 °C durante 5 min, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e adicionaram-se mais 50 µL de MMB e deixou-se a reagir a 120 °C durante 1 h. Após a amostra arrefecer até à temperatura ambiente, adicionaram-se 100 µL de padrão interno (2-desoxiglucose 1 mg/mL) e 100 µL de MMB, evaporando-se no evaporador rotativo sob vácuo até à *secura*.

O resíduo obtido foi dissolvido em 100 µL de ácido acético glacial, sendo de seguida adicionados 450 µL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, num banho de água fria.

A mistura foi agitada e incubada num bloco de aquecimento a 30 °C durante 30 min. Após este período foram adicionados 3 mL de água destilada, para decompor o excesso de anidrido acético. Os acetatos de alditol foram extraídos com 2,5 mL de diclorometano, a mistura foi centrifugada (3000 rpm durante 30 s) e a fase aquosa foi removida por aspiração. A fase orgânica contendo os acetados de alditol foi lavada, duas vezes, com 3 mL de água destilada, tendo-se repetido novamente os passos de agitação, centrifugação e remoção da fase aquosa. O diclorometano foi evaporado no evaporador rotativo sob vácuo até a secura e de seguida adicionou-se 1 mL de acetona anidra que foi seguidamente evaporada.

Os acetatos de alditol foram depois dissolvidos em 50 µL de acetona anidra para serem injetados no cromatógrafo de gás com detetor de ionização de chama (GC-FID), (Perkin Elmer – Claus 400) equipado com uma coluna capilar DB-225 (30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro, 0,15 µm espessura). A temperatura do injetor era de 220 °C e a do detetor 230 °C. A injeção foi realizada em modo “split” (1:60). O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: temperatura inicial 200 °C, aumento até 220 °C a 40 °C/min, mantendo-se a esta temperatura por 7 min, seguido de um aumento até 230 °C a 20 °C/min, ficando a esta temperatura durante 1 min. O gás de arraste foi o hidrogénio (H₂) com um fluxo de 1,7 mL/min e uma pressão de 17 psi. A análise dos açúcares neutros foi realizada em duplicado. Os açúcares foram identificados pelo tempo de retenção por comparação com padrões.

2.3. Análise de ácidos urónicos

A análise de ácidos urónicos foi realizada recorrendo ao método colorimétrico descrito por Coimbra *et al.* [131] sendo necessário realizar uma pré-hidrólise da amostra, por adição de 200 µL de H₂SO₄ 72% a tubos de cultura (10 mL) com cerca de 2-3 mg de amostra. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 3 horas e agitados no vortex duas a três vezes. A hidrólise ocorreu com a adição de 2,2 mL de água destilada de forma a obter no final uma concentração de 1 M de H₂SO₄. Os tubos foram colocados num bloco de aquecimento a 100°C durante 1 h. A uma alíquota de 0,5 mL de hidrolisado foram adicionados 3 mL de água destilada.

Para a determinação de ácidos urónicos foi necessário preparar padrões com concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 µg/mL de ácido galacturónico (200 µg/mL) para a curva

de calibração. Para cada concentração foram preparados 3 tubos (1 branco e 2 réplicas) com 0,5 mL de solução padrão. As alíquotas de 0,5 mL de amostra foram diluídas com 3 mL de água destilada. Para cada amostra ou padrão de ácido galacturónico foram retirados 0,5 mL de solução para 3 tubos de ensaio. Todos os tubos (amostras e padrões) foram colocados num banho de gelo e foram adicionados 3 mL de 50 mM de borato de sódio preparado em ácido sulfúrico concentrado. Taparam-se os tubos com folha de alumínio e agitaram-se bem antes de se colocarem num banho a 100 °C durante 10 min. Foram adicionado, no escuro, 100 µL de *m*-fenilfenol (MFF) 0,15% (m/v) em NaOH 0,5% (m/v) a 2 dos 3 tubos de cada amostra e padrão, sendo que o tubo sem a adição do MFF representa o branco de cada amostra. Agitou-se muito bem, até aparecer cor e deixaram-se a reagir no escuro, durante 30 min. Por fim, os tubos foram de novo agitados para homogeneizar a solução e a absorvância foi lida a 520 nm (Jenway 6405 UV/Vis). As análises aos ácidos urónicos foram realizadas em duplicado.

2.4. Determinação de ésteres de sulfato

A determinação da concentração de ésteres de sulfato na amostra foi realizada através da reação de turbidimetria proposta por Dodgson *et al.* [132]. Nesta análise foi necessário preparar o reagente gelatina – cloreto de bário, através da dissolução de 2 g de gelatina em 400 mL de H₂O quente, seguindo-se um período mínimo de repouso de 6 h a 4 °C. Após este período dissolveram-se 2 g de cloreto de bário no fluido semi-viscoso de gelatina e deixou-se repousar durante 2 a 3 h. Foi também preparada uma solução de gelatina, da forma idêntica ao descrito, sem a adição de cloreto de bário.

Pesaram-se 4 mg de amostra, dissolveram-se em 1 mL de 1 M de HCl e colocou-se num bloco de aquecimento a 105-110 °C durante 5 h, de forma a hidrolisar os ésteres de sulfato. Arrefeceu-se a mistura e transferiram-se 0,2 mL do hidrolisado, em duplicado, para tubos sovirel contendo 3,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) 3% (m/v) e adicionou-se 1 mL do reagente gelatina – cloreto de bário, deixando-se sob agitação durante 20 min. Após o período de agitação leu-se a absorvância a 360 nm (no espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis), tendo sido utilizado como branco uma amostra à qual foi substituída a alíquota de amostra por água destilada. O valor obtido quando se adicionou a amostra à solução

contendo apenas gelatina foi subtraído ao valor obtido para a amostra com gelatina – cloreto de bário.

A concentração de ésteres de sulfato foi determinada através da construção de uma curva de calibração de K_2SO_4 , contendo entre 20 e 200 μg do ião SO_4^{2-} .

2.5. Determinação da proteína

A quantidade de proteína nas amostras foi determinada pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico [133]. A 50 μL de amostra adicionou-se 1 mL de ácido bicinconínico. A mistura foi homogeneizada e incubada a 60 °C durante 15 min. Após 30 min à temperatura ambiente foi lida a absorvância a 562 nm (Jenway 6405 UV/Vis). A proteína solúvel presente foi estimada com base numa curva de calibração construída usando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão com concentrações entre 0,1 e 0,5 mg/mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

2.6. Quantificação da matéria inorgânica

A determinação da concentração de cinzas presente no material polimérico foi feita recorrendo a uma análise de termogravimetria, realizada numa balança termogravimétrica (Setsys Evolution 1750 Setaram) com sensor tipo S. As amostras (6 mg) foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C/min, numa gama de 20 até 600 °C. O gás de purga utilizado foi oxigénio, com um fluxo de 200 mL/min, sendo o teste realizado num cadinho de 170 mL de alumina. Foi realizada uma linha de base prévia, nas mesmas condições que os ensaios, com o cadinho vazio. A massa que permaneceu no cadinho após a combustão corresponde à quantidade de matéria inorgânica presente na amostra.

2.7. Análise de metilação

A determinação do tipo de ligação presente entre os monossacarídeos nas amostras foi realizada por metilação [134,135]. A amostra (1-2 mg) foi seca sob vácuo, na presença de P_2O_5 , durante 18 h. A amostra foi dissolvida em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), tendo ficado sob agitação durante a noite, de forma a que haja uma dissolução completa. Foram adicionado cerca de 40 mg de NaOH triturados com um almofariz sob atmosfera de argon,

e deixado 30 min à temperatura ambiente. Adicionaram-se de seguida 80 µL de iodeto de metilo, e deixou-se a reagir durante 20 min. Este passo foi repetido duas vezes, com duas adições de 80 µL de iodeto de metilo intercaladas com dois períodos de reação de 20 min. A amostra foi dissolvida em 3 mL de uma solução de CHCl₃:MeOH (1:1, v/v) e dialisada contra uma solução aquosa de 50% EtOH. Após a diálise as amostras foram concentradas até à secura no evaporador rotativo sob vácuo. A amostra foi dissolvida em 1 mL de DMSO e o processo de metilação foi repetido como descrito anteriormente.

A amostra, após metilação, foi dissolvida em 500 µL de 2 M de TFA e incubado a 121 °C durante 1 h. Após a hidrólise o TFA foi evaporado recorrendo a um evaporador rotativo sob vácuo.

Os monossacarídeos obtidos foram sujeitos a redução e acetilação. A redução foi realizada por adição de 300 µL de 2 M de NH₃ e 20 mg de NaBD₄ e deixou-se a reagir durante 1 h a 30 °C. Após este período, as amostras foram arrefecidas num banho de gelo e foram adicionados 50 µL de ácido acético glacial por duas vezes. A acetilação foi efetuada por adição de 450 µL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, tendo sido as amostras colocadas a 30 °C durante 30 min. Após este período de incubação foram adicionados, num banho de gelo, 3 mL de H₂O e 2,5 mL de CH₂Cl₂. A amostra foi agitada, centrifugada (3000 rpm durante 30 s) e a fase aquosa removida por aspiração. Este passo foi repetido mais uma vez, seguindo-se a adição de 3 mL de H₂O, agitação, centrifugação e remoção da fase aquosa. O passo de lavagens foi repetido duas vezes. Após as lavagens da amostra o CH₂Cl₂ foi levado à secura no evaporador rotativo sob vácuo, seguindo-se a adição de 1 mL de acetona anidra e novamente evaporada até à secura. A adição de acetona anidra foi repetida, sendo levada novamente à secura.

As amostras foram depois dissolvidas em acetona anidra (50 µL) e injetadas (2 µL) num cromatógrafo de gás (GC) (Agilent technologies 6890 N network), equipado com uma coluna DB-1 de 25 m (QUADREX Corporation, New Haven, CT, USA) com diâmetro interno e a espessura da película de 0,25 mm e 0,05 µm, respetivamente, conectada a um detetor de massa seletivo quadrupolo Agilent 5973. As amostras foram injetadas no modo splitless (5 min) com o injetor a 20 °C. A temperatura inicial do forno do GC foi de 50 °C, aumentando até 140 °C a um ritmo de 8 °C/min. Esta temperatura foi mantida durante 5min, sendo de seguida aumentada até 150 °C a um ritmo de 0,5 °C/min, seguindo-se novo aumento

até 300 °C a 40 °C/min, mantendo durante 1 min. O caudal do gás de arraste (He) foi de 1,7 L/min.

2.8. Dessulfatação

A dessulfatação foi realizada com o intuito de determinar quais os locais de ligação dos esteres de sulfato ao polissacarídeo, recorrendo-se para tal ao protocolo proposto por Miller *et al* [136]. A 10 mg do polissacarídeo foram adicionados 1,8 mL de DMSO, seguindo-se a adição de 0,1 mL de piridina, 13 mg de ácido piromelítico, 12 mg de fluoreto de sódio e 0,2 mL de piridina. Colocou-se a amostra a 120 °C durante 3 h, deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e adicionou-se 1 mL de hidrogenocarbonato de sódio 3%. Dialisou-se a solução contra água destilada, sendo de seguida liofilizada de forma a obter os polissacarídeos dessulfatados.

As amostras dessulfatadas foram de seguida metiladas, tal como descrito no ponto 2.7, permitindo assim determinar quais os locais de ligação de ésteres de sulfato nos polissacarídeos.

2.9. Atividade imunoestimuladora

A atividade imunoestimuladora foi avaliada recorrendo ao protocolo proposto por Passos *et al*. [137]. Os linfócitos foram obtidos por remoção do baço de ratos BALB/c, colocado em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), constituído por aminoácidos e vitaminas num sistema tampão de hidrogenocarbonato, suplementado com penicilina (100 IU/mL), estreptomicina (50 mg/L), 2-mercaptoetanol (0,05 mol/L) e 10% de soro fetal bovino, seguindo-se remoção mecânica das células. As células foram de seguida incubadas numa placa de 96 poços (10⁶ células/poço), juntamente com 50 µL de solução aquosa da amostra com concentrações de 25, 50 e 75 µg/mL, e 50 µL de RPMI. Foram também realizados dois controlos, sendo o controlo negativo realizado através da adição de 100 µL de RPMI e o controlo positivo com a adição de 4 µL de lipopolissacarídeo (LPS) da *Salmonella abortus equi* 50 µg/mL e 96 µL de RPMI. As placas foram de seguida incubadas a 37°C durante 16 a 20 h, numa atmosfera contendo 95% de humidade e 5% de CO₂.

Após este período as células foram incubadas durante 30 min com os anticorpos específicos anti-CD3 FITC e anti-CD19 PE/Cy7 para marcar as células T e B,

respetivamente. Para avaliar a ativação das células usou-se o anticorpo anti-CD69 PE. Após a incubação com os anticorpos, adicionou-se tampão PBS diluído contendo azida de sódio e albumina sérica bovina (BSA), de forma a retirar o excesso de anticorpos. Centrifugaram-se e ressuspenderam-se as células em tampão de PBS/BSA/azida contendo iodeto de propídio de modo a identificar e excluir as células mortas. Por fim, as células foram analisadas por citometria de fluxo (EPLICS XL Beckman Coulter com software EXPO32ADC).

2.10. Diagrama do trabalho realizado:

Na Figura 18 encontra-se esquematizado o trabalho realizado, estando indicados os processos necessários para extrair o material polimérico, bem como as análises realizadas a estes compostos.

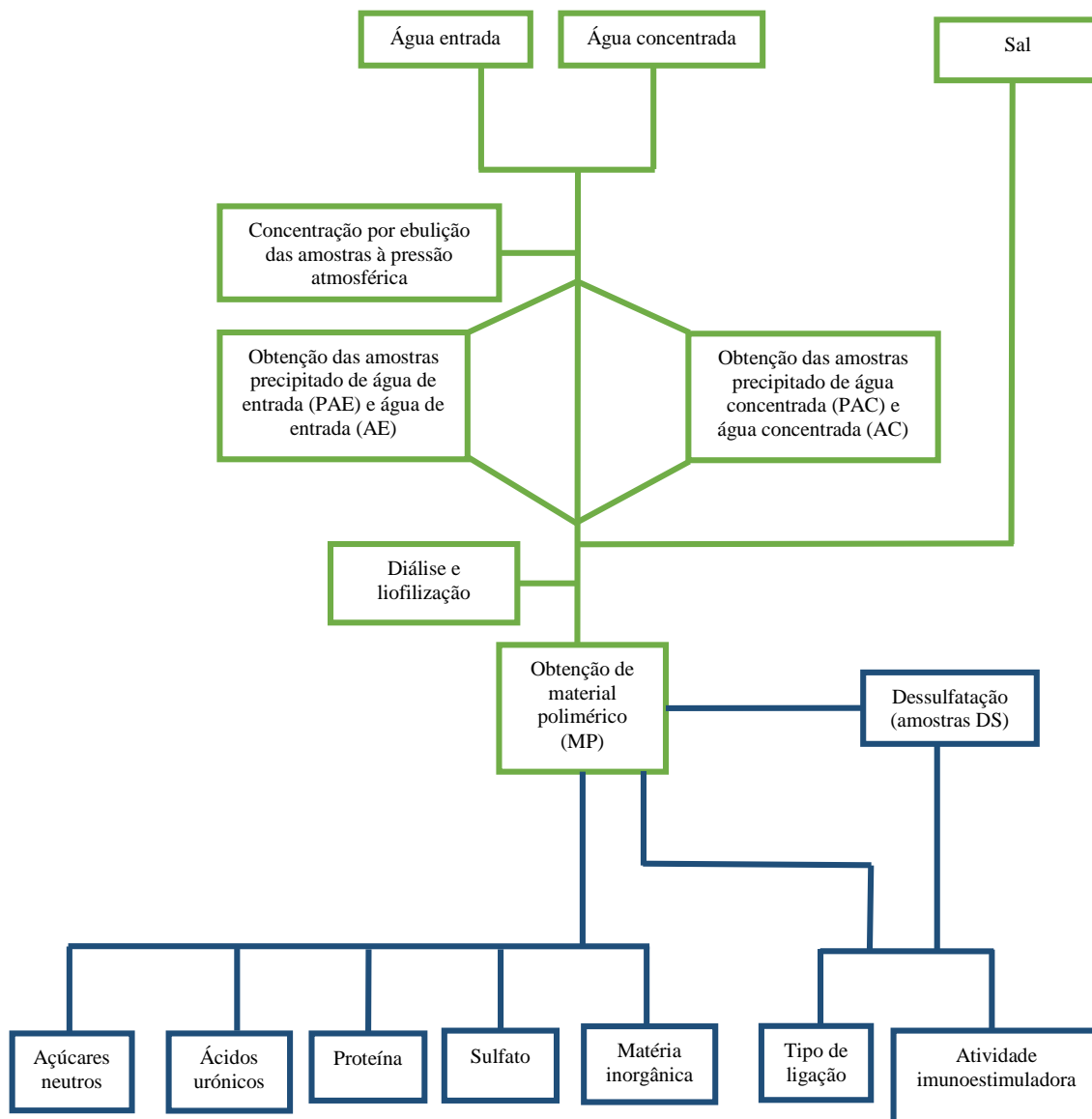


Figura 18 – Diagrama do trabalho realizado.

3 – RESULTADOS/DISCUSSÃO

3.1. Composição do material polimérico

O material polimérico (MP) contido nas amostras água de entrada (AE), água concentrada (AC), os seus precipitados (PAE e PAC respetivamente) e Sal foi obtido após diálise e liofilização do material solúvel em água retido pela membrana de diálise. A amostra AC foi a que apresentou um maior rendimento (613,3 mg/L), quando comparada com a AE (121 mg/L) (Tabela 2). Entre as amostras no estado sólido, o precipitado de água concentrada (PAC) apresentou o maior rendimento, com 336,2 mg/kg, seguindo-se o Sal, com 160,7 mg/kg e, por fim, encontra-se o precipitado de água de entrada (PAE), do qual se obteve 89,1 mg/kg (Tabela 2). O valor de MP obtido para a amostra de Sal encontra-se no intervalo obtido por Silva [17] (46 – 348 mg/kg) para o sal de diferentes localizações assim como para o sal da região de Aveiro (116 – 178 mg/kg). Os valores de MP recolhido nos precipitados PAC e PAE também estão dentro dos valores encontrados por Silva [17] para o sal de diferentes localizações. No entanto, quando comparados com os valores da região de Aveiro, a amostra PAC apresenta um valor superior, enquanto a amostra PAE tem valor inferior ao intervalo.

Tabela 2 - Quantidade de material polimérico e a sua composição.

	Material polimérico extraído	µg/ mg material polimérico				Ésteres de sulfato/Hidratos de carbono
		Hidratos de carbono	Ésteres de sulfato	Proteína	Cinzas	
AE^a	121	418 ± 16	103 ± 2	57 ± 2	112	0,247
AC^a	613	573 ± 18	69 ± 2	52 ± 3	163	0,120
PAE^b	89	274 ± 8	86 ± 3	94 ± 6	180	0,313
PAC^b	336	244 ± 2	51 ± 1	192 ± 6	276	0,208
Sal^b	161	179 ± 2	57 ± 1	92 ± 2	359	0,319

a – valores em mg/L; b – Valores em mg/kg

A composição do material polimérico foi determinada para todas as amostras (Tabela 2), tendo-se observado que os hidratos de carbono são os compostos predominantes, com exceção das amostras PAC e Sal, nas quais as cinzas foram o composto maioritário.

O conteúdo em hidratos de carbono da amostra Sal é de 20% (Tabela 2), encontrando-se abaixo do intervalo obtido por Silva [17] (27 – 47%) para diferentes amostras de sal. Entre todas as amostras analisadas a que apresentou um maior conteúdo em hidratos de carbono foi a AC (57%), seguindo-se a AE (42%). Os precipitados, PAE e PAC, têm 27 e 24% de hidratos de carbono, respetivamente.

Assumindo que a diálise foi completa, é possível inferir que o sulfato quantificado seja proveniente dos polissacarídeos. O valor em sulfatos obtido para a amostra Sal (5,7%) (Tabela 2) encontra-se abaixo do intervalo descrito na bibliografia (8 – 25%) [17]. Este resultado está de acordo com o baixo conteúdo em hidratos de carbono obtido nesta amostra, sendo mais uma evidência de que os sulfatos poderão ser provenientes dos polissacarídeos. O maior conteúdo de sulfato verificou-se para as amostras AE e PAE (10 e 8,5%, respetivamente), enquanto as amostras AC e PAC apresentaram valores inferiores, 6,9% e 5,1%, respetivamente (Tabela 2). Tendo em conta a quantidade de sulfato e de hidratos de carbono quantificados por amostra, verifica-se que a amostra Sal apresenta a maior razão (0,319) entre todas as amostras, permitindo inferir que os polissacarídeos com maior grau de sulfatação são os presentes na amostra Sal (Tabela 2). As amostras PAE e AE apresentaram uma razão de 0,313 e 0,247, respetivamente, indicando que os polissacarídeos da AE têm um grau de sulfatação inferior à amostra Sal. As amostras PAC e AC foram as que apresentaram uma razão inferior de todas as amostras (0,208 e 0,120, respetivamente), demonstrando que poderão ser constituídos por polissacarídeos com menor conteúdo em sulfato.

A quantidade de polissacarídeos sulfatados presentes nas amostras, obtidos pela soma dos hidratos de carbono com os ésteres de sulfato indicam que a amostra Sal (23%), tal como já tinha sido referido, tem um baixo conteúdo comparado com o descrito na bibliografia para sal marinho (36 – 70%) [17]. As amostras líquidas, AC e AE, apresentam quantidades superiores com 64% e 52%, respetivamente, de polissacarídeos sulfatados no MP, sendo as amostras mais ricas em polissacarídeos. Os precipitados obtidos por ebulição destas amostras apresentam 30% de polissacarídeos sulfatados na PAC e 35% na PAE.

A percentagem de proteína determinada na amostra Sal (9%) (Tabela 2) encontra-se no intervalo já descrito na bibliografia [17] (2 – 9%). A maior concentração de proteína foi obtida na amostra PAC (19%), seguindo-se PAE com 9,4%. As amostras AE e AC apresentaram um valor inferior de proteína de 5,7 e 5,2% respetivamente. Estes resultados

indicam a presença de proteínas com baixa solubilidade em água, uma vez que estas tendem a co-precipitar com o sal, o que está de acordo com o facto das amostras AE e AC serem mais ricas em polissacarídeos.

A análise às cinzas presentes nas amostras foi realizada por termogravimetria, sendo os resultados apresentados na Tabela 2. É possível observar que as cinzas presentes na amostra Sal (35,9%) encontram-se no intervalo de cinzas descrito na bibliografia (20 e 40%) [17]. As restantes amostras apresentam um valor de cinzas inferior ao observado no sal, sendo as amostras obtidas por ebulição das águas as que apresentam uma maior concentração de matéria inorgânica (28 e 18% para as amostras PAC e PAE, respetivamente). As amostras AC e AE apresentam 16,3% e 11,2, respetivamente. O elevado conteúdo de cinzas nas amostras analisadas tem a contribuição dos ésteres de sulfato dos polissacarídeos. Estes compostos degradam a 800 °C [138] e, como neste ensaio apenas se utilizaram temperaturas até 600 °C, nos valores de cinza estão também incluídos os ésteres de sulfato. No entanto, o elevado teor em cinzas das amostras Sal e PAC em relação ao baixo conteúdo em ésteres de sulfato permite inferir que o material polimérico destas amostras possui maior capacidade para ligar material inorgânico que o das amostras AC, AE e PAE.

Os resultados da composição do material polimérico realizado às 5 amostras permitem concluir a amostra AC, proveniente da água do tanque de água concentrada do cristalizador após a ebulição, foi a que apresentou um conteúdo em material polimérico mais elevado (613 mg de MP/L de amostra) com uma maior quantidade em hidratos de carbono (57%). Deste modo, a amostra AC é que apresenta maior potencial para ser utilizada para a extração de polissacarídeos sulfatados.

3.2. Polissacarídeos do material polimérico

3.2.1. Composição em monossacarídeos

A composição em monossacarídeos das amostras encontra-se na tabela 3. As amostras AE e AC apresentam uma composição em monossacarídeos semelhante, contendo principalmente ácidos urónicos (39 e 57% mol respetivamente), seguindo-se a Fuc (11 e 8%), Gal (10 e 7%), Glc (10 e 5%) Rha (10 e 5 %), Man (6 e 4%) e a Xyl (5%). Os resíduos detetados em menor percentagem foram a Ara (4%) e a Rib (< 1%).

Tabela 3 – Composição em monossacarídeos das amostras de água de salina e sal.

	%molar									
	dRib	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Á. Ur
AE	-	10,0 ± 0,4	11,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	4,1 ± 0,2	5,6 ± 0,4	6,8 ± 0,4	10,8 ± 0,2	10,8 ± 0,3	39,0 ± 1,6
AC	-	5,5 ± 0,2	8,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	4,5 ± 0,4	5,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2	7,1 ± 0,6	5,9 ± 0,6	57,5 ± 0,1
PAE	2,6 ± 0,1	21,3 ± 0,5	7,7 ± 0,5	1,1 ± 0,3	2,0 ± 0,0	4,5 ± 0,1	5,0 ± 0,4	7,7 ± 0,2	18,9 ± 1,0	29,0 ± 0,2
PAC	3,2 ± 0,1	8,6 ± 0,5	12,5 ± 0,5	1,7 ± 0,3	6,1 ± 0,0	8,2 ± 0,1	6,5 ± 0,4	11,1 ± 0,2	11,4 ± 1,0	30,4 ± 0,2
Sal	0,9 ± 0,0	8,1 ± 0,2	13,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	5,4 ± 0,1	7,8 ± 0,0	8,5 ± 0,1	12,3 ± 0,3	15,3 ± 0,4	26,6 ± 0,7

A amostra PAE apresenta na sua composição maioritariamente ácidos urónicos (29%), seguindo-se Rha (21%), Glc (18%), Gal e Fuc (7%) e Man (5%). Em menor quantidade foram detetados Xyl (4%), dRib (2%), Ara (2%) e Rib (1%). A amostra PAC é também maioritariamente constituída por ácidos urónicos (30%), Fuc (12%), Gal e Glc (11%), Xyl e Rha (8%) e Ara e Man (6%). Os resíduos minoritários observados foram a dRib (3%) e a Rib (1%).

A amostra de Sal é também maioritariamente constituída por ácidos urónicos (26%), Glc (15%), Fuc (13%), Gal (12%), Man e Rha (8%) e Xyl (7%). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Silva [17], embora hajam diferenças em alguns resíduos. As diferenças verificadas entre o Sal em estudo e os dados já publicados indicam que a origem e o ano em que são obtidos os polissacarídeos são fatores que contribuem para a variação na composição em monossacarídeos.

Em todas as amostras analisadas os ácidos urónicos foram os resíduos de monossacarídeos maioritários (entre 26 e 57 %), o que pode contribuir para a elevada solubilidade em soluções aquosas dos polissacarídeos presentes nas amostras. Os vários tipos de monossacarídeos identificados apontam para a possível existência de uma grande diversidade de polissacarídeos presentes, o que está de acordo com os resultados de Silva [17]. Apesar da diversidade de estruturas possíveis, os elevados níveis de ácidos urónicos, ramnose, fucose e xilose, indicam que podem estar presentes na amostra ulvanas e fucoïdanas, pois estes são os seus monossacarídeos característicos.

A presença de glucose nas amostras PAE, PAC e Sal podem ser originárias de glucanas. Agaranas e/ou carragenanas podem também dar origem à galactose. A presença de ribose em todas as amostras, ainda que em concentrações bastante reduzidas, e de dRib

nas amostras no estado sólido pode ser devido à presença de moléculas de DNA e RNA no sal e nas águas de salina, provenientes dos organismos que toleram elevadas salinidades.

3.2.2. - Análise de ligações glicosídicas

De modo a poder determinar quais os resíduos de monossacarídeos sulfatados e identificar o tipo de ligação glicosídica, procedeu-se à análise de metilação das amostras antes e após dessulfatação. O tipo de ligação entre os monossacarídeos, bem como a posição das sulfatações foi determinada através do aumento/decréscimo de alguns resíduos após a dessulfatação. A presença de alguns resíduos após a dessulfatação indica o tipo de ligação, uma vez que esse tratamento às amostras vai remover as substituições com ésteres de sulfato.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos para os resíduos de ramnose antes e após a dessulfatação. É possível observar a presença de Rha em ligação (1→3) uma vez que foi identificado 2,4-Me₂-Rha, ligação já observada em polissacarídeos extraídos das algas verdes [139]. É identificada também a ligação (1→2), pela presença de 3,4-Me₂-Rha, embora este tipo de ligação não tenha sido ainda descrita na bibliografia. A presença de 3-Me-Rha permite inferir que a ramnose se encontra também em ligação (1→2,4). A diminuição do resíduo não metilado de Rha permite inferir a sulfatação destes resíduos em C-3, tendo esta estrutura já sido descrita em polissacarídeos de *Ulva* [124]. Observou-se também o aumento do resíduo 2,3,4-Me₃-Rha e o decréscimo de 3,4-Me₂-Rha, indicando que poderão estar presentes resíduos de ramnose terminais sulfatados em C-2. Esta característica estrutural já foi identificada em polissacarídeos extraídos de algas [139]. Todas as substituições observadas para esta amostra foram também observadas por Silva [17] para os polissacarídeos presentes no sal, e por Ray *et al.* [124] nos polissacarídeos da parede celular das algas verdes.

Tabela 4 – Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de ramnose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AE	AE DS	PAE	PAE DS	AC	AC 1ª DS	AC 2ª DS	PAC	PAC DS	Sal	Sal DS
2,3,4-Me ₃ -Rha	t-Rha	18,9	23,3	6,4	7,9	31,2	11,0	20,2	19,4	29,0	22,0	20,6
3,4-Me ₂ -Rha	2-Rha	45,2	20,9	70,7	83,6	8,1	49,7	31,7	28,8	27,5	27,8	38,7
2,4-Me-Rha	3-Rha	11,1	20,6	5,2	5,0	17,1	16,8	17,6	9,1	20,8	8,2	8,8
3-Me-Rha	2,4-Rha	8,1	16,1	6,8	3,4	10,5	10,6	9,6	7,2	6,0	5,6	9,0
4-Me-Rha	2,3-Rha	7,2	12,6	10,8	-	17,1	11,9	20,9	17,5	6,1	9,3	6,1
Rha	2,3,4-Rha	9,5	6,5	-	-	16,0	-	-	18,0	10,6	27,2	16,7

A presença de 2,3-Me₂-Xyl e 2,3,4-Me₃-Xyl após a dessulfatação (Tabela 5) indica que se encontra nestas amostras xilose em ligação (1→4) e em ligação terminal, estrutura bastante comum em ulvanas [140]. O decréscimo observado no resíduo não metilado de Xyl e o aumento do resíduo 2,3-Me₂-Xyl após a dessulfatação indica que a Xyl se encontra sulfatada em C-2 e C-3. Os resíduos identificados foram também observados por Silva [17] para polissacarídeos de diferentes sais.

Tabela 5 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de xilose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AE	AE DS	PAE	PAE DS	AC	AC 1ª DS	AC 2ª DS	PAC	PAC DS	Sal	Sal DS
2,3,4-Me ₃ -Xyl	t-Xylp	31,2	40,3	50,8	78,0	43,3	74,6	50,4	47,0	61,2	47,7	62,3
2,3-Me ₂ -Xyl	4-Xyl	35,8	50,3	-	-	48,1	25,4	42,1	34,3	38,8	31,4	37,7
Xyl	2,3,4-Xyl	32,9	9,4	49,2	22,0	8,6	-	7,5	18,7	-	20,9	-

Os resíduos 3,4-Me₂-Fuc, 2,3-Me₂-Fuc e Fuc não metilado foram identificados após a dessulfatação das amostras (Tabela 6), o que indica que estão presentes polissacarídeos constituídos por fucose em ligação (1→3), (1→4) e terminal, sendo a ligação (1→3) predominante em todas as amostras. Estas ligações são características das fucoidanas [102,103]. Observou-se também a presença do resíduo 4-Me-Fuc, levando a concluir que podem estar presentes fucoses em ligação (1→2,3) [102]. A diminuição da Fuc não metilada e o aumento da 3,4-Me₂-Fuc após dessulfatação indica a presença de fucose em ligação (1→3), dissulfatada em C-2 e C-4, estrutura já descrita em fucoidanas [141]. O aumento do resíduo 2,3-Me₂-Fuc pode também indicar que se encontram fucose em ligação (1→4),

dissulfatada em C2 e C3, estrutura descrita nos polissacarídeos de algas castanhas [102]. A diminuição de Fuc não metilada e o surgimento da 4-Me-Fuc leva também a propor a presença de fucose em ligação (1→2,3) sulfatada em C-4, como já observado fucoïdanas de algas castanhas [142]. Todas as substituições observadas nas amostras em estudo foram também observados Silva quando analisou polissacarídeos sulfatados extraídos do sal, com a exceção de 2,3-Me₂-Fuc [17]. Todas as estruturas propostas foram já reportadas em fucoïdanas de *Fucus vesiculosus* [143].

Tabela 6 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de fucose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AE	AE DS	PAE	PAE DS	AC	AC 1 ^a DS	AC 2 ^a DS	PAC	PAC DS	Sal	Sal DS
2,3,4-Me ₃ Fuc	t-Fuc	29,5	21,5	26,1	25,9	30,1	28,0	48,7	21,0	36,8	24,0	22,6
3,4-Me ₂ Fuc	3-Fuc	26,3	22,9	73,9	74,1	16,9	17,9	41,4	14,8	32,2	14,4	13,2
4-Me Fuc	2,3-Fuc	-	-	-	-	-	6,7	-	-	-	-	-
2,3-Me ₂ Fuc	4-Fuc	6,9	2,0	-	-	5,2	3,6	9,9	2,7	8,0	6,3	5,7
Fuc	2,3,4-Fuc	37,3	53,6	-	-	47,8	43,8	-	61,5	23,0	55,3	58,5

A ocorrência de 2,3,4,6-Me₄-Gal, 3,4,6-Me₃-Gal, 2,4,6-Me₃-Gal, 2,3,6-Me₃-Gal, e 2,3,4-Me₃-Gal após a dessulfatação (Tabela 7), indica a presença de galactose em ligação terminal, (1→2), (1→3), (1→4) e (1→6), respetivamente, características de carragenanas e agaranas [69,95]. Após a dessulfatação os resíduos 2,6-Me₂-Gal e 2,4-Me₂-Gal continuam a ser identificados, o que indica a presença de galactose em ligação (1→3,4) e em ligação (1→3,6), respetivamente [75,91]. A presença do resíduo 2,3-Me₂-Gal indica que está presente na amostra galactose em ligação (1→4,6) [91–94]. O aumento de 2,3,6-Me₃-Gal e a diminuição da 2,6-Me₂-Gal após a dessulfatação leva a propor que esteja presente nas amostras galactose em ligação (1→4), sulfatada em C-3, já descrita em polissacarídeos extraídos das algas vermelhas [91]. Em todas as amostras verifica-se a diminuição de 2-Me-Gal e o aumento da 2,6-Me₂-Gal, indicando que também está presente galactose em ligação (1→3,4), sulfatada em C-6. Estas estruturas já foram descritas em polissacarídeos extraídos de algas vermelhas [79]. O surgimento do resíduo 2,3-Me₂-Gal acompanhado pelo decréscimo de 2-Me-Gal após a dessulfatação indica-nos que nas amostras se encontra galactose em ligação (1→4,6), sulfatada em C-3 [144]. O aumento de 2,4,6-Me₃-Gal e a diminuição de 2,4-Me₂-Gal e 4,6-Me₂-Gal pode ser devido à presença de galactose em

ligação (1→3) sulfatada em C-6 ou C2, estruturas descritas em polissacarídeos extraídos das algas vermelhas [91]. Todas as ligações foram observadas por Siva [17] em amostras de polissacarídeos obtidos de sal marinho.

Tabela 7 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de galactose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AE	AE DS	PAE	PAE DS	AC	AC 1 ^a DS	AC 2 ^a DS	PAC	PAC DS	Sal	Sal DS
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	t-Gal	5,3	26,2	12,9	20,4	23,8	23,0	25,1	11,6	26,4	5,9	30,8
3,4,6-Me ₃ -Gal	2-Gal	-	-	24,0	28,7	-	16,4	26,4	-	-	-	-
2,4,6-Me ₃ -Gal	3-Gal	22,8	14,5	23,8	18,1	18,0	-	21,6	11,0	16,6	10,2	33,6
2,3,6-Me ₃ -Gal	4-Gal	-	10,9	-	-	-	28,9	6,1	-	-	-	-
2,3,4-Me ₃ -Gal	6-Gal	2,0	13,5	5,6	7,0	4,3	5,7	3,1	2,8	16,2	2,6	7,0
4,6-Me ₂ -Gal	2,3-Gal	-	-	-	-	-	2,7	-	-	-	1,1	-
2,6-Me ₂ -Gal	3,4-Gal	1,9	2,8	3,0	7,9	8,4	10,2	-	3,0	10,2	-	-
3,6-Me ₂ -Gal	2,4-Gal	4,0	10,8	4,0	4,9	10,4	5,5	5,7	6,7	10,9	3,6	8,5
2,4-Me ₂ -Gal	3,6-Gal	2,4	10,7	4,8	4,2	8,7	2,1	3,4	5,5	-	3,3	2,1
2,3-Me ₂ -Gal	4,6-Gal	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
2-Me-Gal	3,4,6-Gal	1,0	2,4	3,9	2,3	3,1	-	1,9	6,5	-	1,9	1,1
Gal	2,3,4,6-Gal	60,7	8,3	18,0	6,6	23,4	6,3	6,7	53,0	19,8	71,3	16,8

A identificação dos resíduos de 2,4,6-Me₃-Glc e 2,3,6-Me₃-Glc (tabela 8) indicam que nas amostras está presente glucose em ligação (1→3) e (1→4), respectivamente, característica das algas vermelhas [146]. O resíduo 3,4,6-Me₃-Glc identificado após a dessulfatação indica a presença de glucose em ligação (1→2) embora esta ligação não tenha sido descrita na literatura em polissacarídeos de origem marinha. A presença do resíduo 2,3,4,6-Me₄-Glc e o seu aumento após a dessulfatação, acompanhado pela diminuição de 2,3,4-Me₃-Glc, indica que está presente glucose terminal, que pode estar sulfatada em C-6, substituição também identificada em polissacarídeos das algas vermelhas [146]. Apesar da sua diminuição com a dessulfatação, o resíduo 2,3,4-Me₃-Glc foi ainda identificado nestas amostras, indicando que se encontra presente glucose em ligação (1→6), ligação já descrita em polissacarídeos extraídos de algas castanhas [145]. O aumento de 2,3,6-Me₃-Glc e a diminuição de 2,3-Me₂-Glc após a dessulfatação indica a presença de glucose em ligação (1→4), sulfatada em C-6, estrutura também observada nos polissacarídeos de origem marinha [146]. O resíduo 2-Me-Glc apesar de diminuir continua a ser identificado após a dessulfatação, tendo sido também descrito em polissacarídeos extraídos de esponjas

marinhas [147]. Todos os resíduos presentes nas amostras analisadas (Tabela 8) estavam presentes nas amostras de sal marinho analisadas por Silva [17], com a exceção de 2,3,6-Me₃Glc e 3,4,6-Me₃Glc.

Tabela 8 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de glicose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AE	AE DS	PAE	PAE DS	AC	AC 1 ^a DS	AC 2 ^a DS	PAC	PAC DS	Sal	Sal DS
2,3,4,6-Me ₄ Glc	t-Glc	16,0	13,2	8,4	13,0	17,9	27,2	20,2	10,3	21,2	9,6	15,7
3,4,6-Me ₃ Glc	2-Glc	6,6	4,5	8,8	6,8	4,2	18,2	9,6	4,2	9,1	4,3	3,0
2,3,6-Me ₃ Glc	4-Glc	15,6	60,6	48,9	65,4	33,0	14,3	44,1	20,7	33,4	27,4	52,5
2,3,4-Me ₃ Glc	6-Glc	19,3	5,2	3,8	3,6	11,3	1,5	-	6,1	6,9	3,3	7,4
2,4,6-Me ₃ Glc	3-Glc	-	-	-	-	-	4,4	-	-	-	-	-
2,3-Me ₂ Glc	4,6-Glc	4,4	3,6	2,9	-	3,3	4,6	4,0	4,1	-	3,0	1,9
2,4-Me ₂ Glc	3,6-Glc	-	-	-	-	-	9,4	-	-	-	-	-
6-Me Glc	2,3,4-Glc	14,2	2,8	3,8	1,8	9,2	6,4	4,9	8,5	9,1	5,8	2,9
3-Me Glc	2,4,6-Glc	-	-	-	-	-	-	-	-	8,7	-	-
2-Me Glc	3,4,6-Glc	13,1	4,1	3,0	0,9	1,6	7,7	5,0	7,2	3,4	4,6	4,2
4-Me Glc	2,3,6-Glc	10,8	1,8	4,4	1,5	3,1	4,0	1,7	5,8	-	4,1	2,8
Glc	2,3,4,6-Glc	37,6	4,3	16,0	6,9	16,2	7,9	10,4	33,0	12,7	37,9	9,5

A presença das substituições 2,4,6-Me₃-Man e 4,6-Me₂-Man após a dessulfatação (Tabela 9) indica-nos que nas amostras podem estar presentes resíduos de manose em ligação (1→3) e (1→2,3) [148]. A presença de 2,3-Me₂-Man indica que também existe manose em ligação (1→4,6), ligação já observada em polissacarídeos extraídos das algas vermelhas [146]. A presença de 2,3,4,6-Me₄-Man e 2,3,4-Me₃-Man após a dessulfatação permite concluir que se encontram manoses em ligação terminal e em ligação (1→6), respetivamente, embora estas ligações não tenham sido descritas na bibliografia para polissacarídeos de ambientes marinhos. O decréscimo de 2,6-Me₂-Man e o aumento de 2,4,6-Me₃-Man após a dessulfatação é justificado pela presença de manose em ligação (1→3) e sulfatada em C-4, estrutura já descrita em polissacarídeos extraídos da alga vermelha [148]. Os resíduos observados nestas amostras foram também identificadas por Silva [17] em amostras obtidas a partir de sal marinho, exceção para os resíduos 2,3,4-Me₃-Man e 2,4,6-Me₃-Man.

Tabela 9 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de manose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AE	AE DS	PAE	PAE DS	AC	AC 1 ^a DS	AC 2 ^a DS	PAC	PAC DS	Sal	Sal DS
2,3,4,6-Me ₄ Man	t-Man	10,0	23,8	16,1	29,7	19,7	25,5	33,0	8,3	24,4	19,4	27,2
2,3,4-Me ₃ Man	6-Man	-	-	-	-	-	-	7,1	-	-	-	-
2,4,6-Me ₃ Man	3-Man	-	-	-	-	-	12,4	-	-	-	-	-
2,6-Me ₂ Man	3,4-Man	7,9	35,8	43,6	29,3	35,5	2,8	16,4	26,7	19,3	25,9	39,9
4,6-Me ₂ Man	2,3-Man	5,4	20,9	12,2	18,0	13,1	28,6	20,1	11,8	24,8	7,6	2,4
2,3-Me ₂ Man	4,6-Man	2,0	7,4	-	9,7	4,9	-	8,7	6,8	-	9,6	-
2-Me Man	3,4,6-Man	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-
Man	2,3,4,6-Man	74,8	12,0	28,1	13,3	26,7	29,7	14,6	46,4	31,6	37,5	30,6

A presença de 3,5-Me₂-Araf, 2,5-Me₂-Araf e 2,3-Me₂-Araf após a dessulfatação (Tabela 10) indica que nas amostras analisadas estão presentes arabinoses em ligação (1→2), (1→3) e (1→5) respectivamente. Por seu lado a presença de 2-Me-Araf indica-nos resíduos de arabinose em ligação (1→3,5), como foi descrito para polissacarídeos das algas verdes [127]. A presença de 2,3,5-Me₃-Araf permite inferir que se encontram resíduos arabinose na ligação terminal. Embora estes resíduos estejam descritos na bibliografia, a presença de arabinose em polissacarídeos de origem marinha é sempre descrita como estando presente em pequenas concentrações [127,148–150], tal como observado nas amostras analisadas. Todas estas substituições foram também reportadas em polissacarídeos do sal marinho [17].

Tabela 10 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de arabinose presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AE	AE DS	PAE	PAE DS	AC	AC 1 ^a DS	AC 2 ^a DS	PAC	PAC DS	Sal	Sal DS
2,3,5-Me ₃ Araf	t-Araf	15,7	20,4	4,1	4,0	12,5	12,3	9,0	11,3	19,1	14,9	16,6
3,5-Me ₂ Araf	2-Araf	4,4	6,8	-	-	11,4	23,3	17,6	9,7	14,9	7,8	9,8
2,5-Me ₂ Araf	3-Araf	2,7	3,6	23,5	30,4	6,8	2,6	7,7	6,7	11,5	5,9	4,4
2,4,5-Me ₃ Arap	3-Arap	17,9	5,4	11,3	-	11,3	-	13,7	10,3	12,5	9,1	11,4
2,3-Me ₂ Araf	5-Araf	4,2	16,4	-	9,8	10,1	7,2	8,6	11,9	13,2	3,8	10,3
2-Me ₂ Araf	3,5-Araf	11,0	3,8	40,8	45,9	8,0	54,5	12,5	7,8	-	4,4	3,8
3,5-Me ₂ Arap	2,4-Arap	3,7	-	-	9,8	11,4	-	8,5	9,6	6,0	7,7	4,7
Araf	2,3,5-Araf	40,4	43,5	20,3	-	28,6	-	22,5	32,7	22,8	46,5	39,0

A análise de metilação revelou a presença de N-Acetilglucosamina (GlcNAc), apesar deste monossacarídeo não ter sido detetado na análise de açúcares. Este resíduo pode ser encontrado na quitina, um polissacarídeo presente no exosqueleto de crustáceos [151]. A

presença dos resíduos 2,4,6-Me₃-GlcNAc, 2,3,6-Me₃-GlcNAc e 2,3,4-Me₃-GlcNAc (Tabela 11) indicam que a GlcNAc se pode encontrar em ligação (1→3), (1→4) e (1→6), respetivamente, embora apenas a ligação (1→4) tenha sido descrita [151–154]. A análise comparativa às metilações antes e depois da dessulfatação indicam um decréscimo de 2,6-Me₂-GlcNAc e o aumento de 2,3,6-Me₃-GlcNAc, podendo estes resultados ser explicados pela presença de GlcNAc em ligação (1→4) sulfatado em C-3, apesar de ainda não ter sido descrito da bibliografia. Estes resíduos não foram descritos nos polissacarídeos do sal marinho analisados por Silva [17]. A baixa concentração deste resíduo observado nas amostras analisadas pode ser justificado com a baixa solubilidade em água apresentada pelos polissacarídeos em que este resíduo está presente [152].

Tabela 11 - Abundância relativa dos diferentes derivados parcialmente metilados de N-Acetilglucosamina presentes antes e após dessulfatação (DS) dos polissacarídeos do MP.

Derivados metilados	Derivados de açúcar	AE	AE DS	PAE	PAE DS	AC	AC 1 ^a DS	AC 2 ^a DS	PAC	PAC DS	Sal	Sal DS
2,3,6-Me ₃ -GlcNAc	4-GlcNAc	10,8	30,3	24,8	34,0	17,0	16,8	18,2	16,5	28,3	18,6	25,5
2,3,4-Me ₃ -GlcNAc	6-GlcNAc	4,3	7,6	5,5	4,7	8,6	8,3	7,2	6,6	11,6	5,5	9,7
2,4,6-Me ₃ -GlcNAc	3-GlcNAc	22,6	25,5	24,4	24,4	19,1	24,7	28,6	22,9	26,8	21,4	19,7
2,6-Me ₂ -GlcNAc	3,4-GlcNAc	62,4	36,6	45,3	36,8	55,3	50,2	46,0	53,9	33,3	54,5	45,2

Uma segunda dessulfatação foi apenas realizada à amostra AC, uma vez que foi a amostra que apresentou a maior concentração de polissacarídeos sulfatados, e teve como intuito determinar se a realização de um segundo processo de dessulfatação da amostra levaria a uma mais eficiente remoção de ésteres de sulfato do polissacarídeo uma vez que, como descrito na bibliografia [136], esta técnica pode não remover totalmente os ésteres de sulfato. Apesar dos resultados obtidos para os resíduos não metilados de Fuc e Man indicarem que a segunda dessulfatação foi mais eficaz, uma vez que se trata de resíduos totalmente substituídos e o decréscimo observado entre uma e duas dessulfatações, indica que foi possível ainda remover mais alguns ésteres de sulfato, para os restantes resíduos não se verificaram variações com a segunda dessulfatação. Não foram feitos mais ensaios acerca da necessidade de uma segunda dessulfatação dada a morosidade do processo e a quantidade elevada de amostra necessária para o ensaio.

3.3. Avaliação da atividade imunoestimuladora

Os polissacarídeos sulfatados de origem marinha, segundo descrito na bibliografia, apresentam atividade imunoestimuladora, mais especificamente as galactanas sulfatadas [34–36,155,156], as ulvanas [59] e as fucoidanas [157,158], tendo todas as amostras analisadas revelado a presença destes polissacarídeos sulfatados. Por esse motivo foi avaliada a atividade imunoestimuladora da amostra AC, uma vez que foi a amostra que apresentou a maior concentração em polissacarídeos sulfatados, tendo sido testadas três concentrações diferentes de polissacarídeos (25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$). A atividade imunoestimuladora foi determinada no extrato original e após dessulfatação para determinar se a amostra tinha efeito biológico e qual o efeito da presença de sulfatos. Os testes foram realizados no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) no Porto.

A primeira análise a ser realizada nas amostras foi a citotoxicidade (Figura 19). A percentagem de viabilidade celular foi superior a 96% para todas as amostras incluindo os controlos, tanto negativo (RPMI) como positivo (LPS), o que indica que as amostras não são citotóxicas.

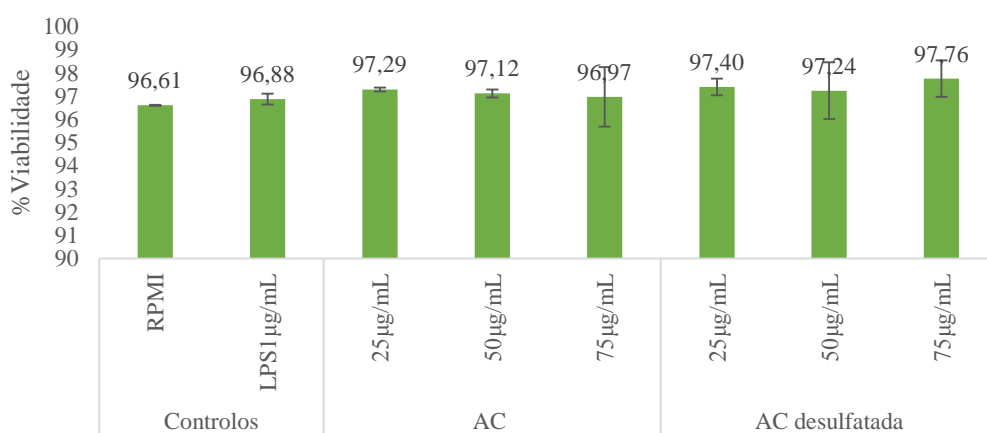


Figura 19 - Percentagem de viabilidade celular após incubação com a amostra. RPMI – Controlo negativo para imunoestimulação; LPS – Controlo positivo imunoestimulação.

Os testes de imunoestimulação foram realizados em duas linhagens celulares, linfócitos T e B, tendo sido sempre utilizados dois controlos, um positivo (LPS) e um negativo (RPMI). Os resultados obtidos para a estimulação de linfócitos B (Figura 20)

indicam uma percentagem de estimulação entre 40 e 50 % para as amostras AC, sendo possível observar ainda uma tendência para o aumento desta estimulação com o aumento da concentração, embora não seja significativo. No entanto, a amostra AC dessulfatada apresentou percentagens de estimulação próximas de 20%, valor inferior ao observado para a amostra nativa. O aumento de concentração de polissacarídeo não levou ao aumento da estimulação. É provável que a pequena percentagem de estimulação observada seja devido a algumas substituições com éster de sulfato que não tenham sido completamente removidas durante o processo de dessulfatação.

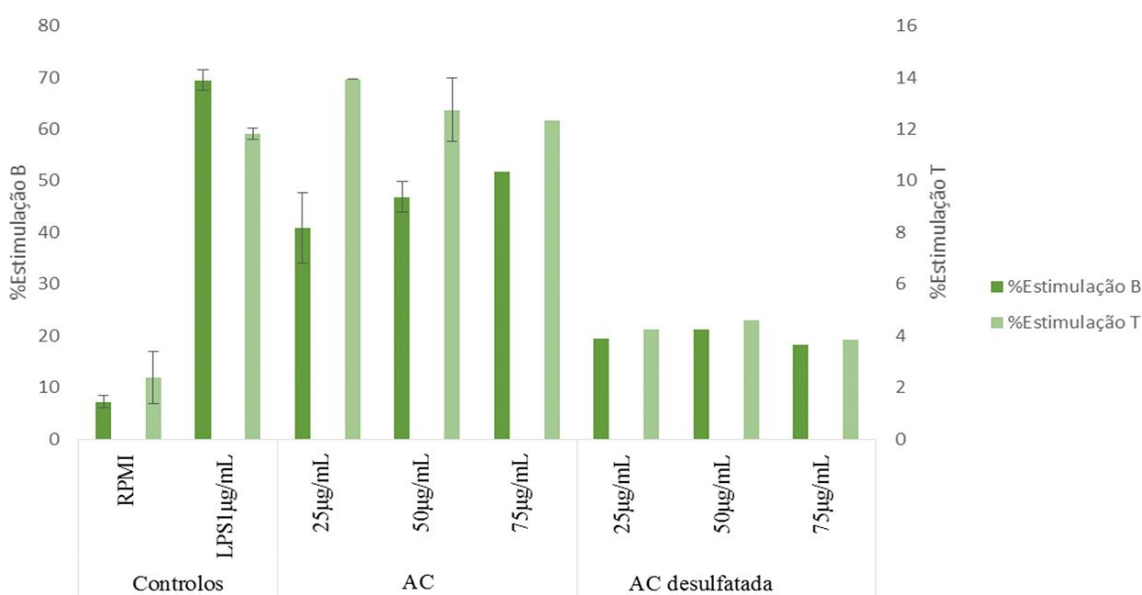


Figura 20 – Percentagem de estimulação para células B e células T. RPMI – Controlo negativo para imunoestimulação; LPS – Controlo positivo imunoestimulação

Os resultados obtidos para a estimulação de linfócitos T (Figura 20) demonstram que a amostra AC levou a uma estimulação próxima de 15%, sendo este valor próximo do observado para o controlo positivo (12%), tendo-se observado que o aumento da concentração de polissacarídeos não leva ao aumento da estimulação. A amostra AC dessulfatada levou a uma estimulação de apenas 4%, valor próximo do controlo negativo (2%), sendo que não se observaram diferenças na estimulação quando se aumentou a concentração do polissacarídeo.

Os resultados obtidos nestes ensaios demonstram que estão presentes na amostra compostos com potencial para atividade imunoestimuladora, embora sejam necessários mais

testes para determinar quais os mecanismos responsáveis pela estimulação tanto de linfócitos B como T. A complexidade da amostra não permite determinar quais os compostos responsáveis pelos efeitos observados. No entanto, a amostra é constituída maioritariamente por polissacarídeos sulfatados. Foi ainda possível observar que quando se incubavam as linhagens celulares com a amostra dessulfatadas a percentagem de estimulação decrescia consideravelmente, indicando que o efeito observado pode ser devido à presença de polissacarídeos sulfatados, sendo a sulfatação um fator determinante nesta atividade.

Os ensaios realizados em linfócitos descritos na bibliografia indicam resultados semelhantes aos observados. No trabalho realizado por Yuan *et al.* [35] foi testada a capacidade para estimular a produção de linfócitos por parte de oligossacarídeos de κ -carragenanas. Estes autores observaram que os compostos apresentam capacidade para aumentar a proliferação de linfócitos, embora também não se observe um aumento da estimulação quando se aumenta a concentração dos oligossacarídeos. O aumento na sulfatação destes oligossacarídeos originou um aumento da estimulação de linfócitos, em relação à amostra com baixo grau de sulfatação. Estas observações estão de acordo com os resultados obtidos para as amostras em estudo, nas quais o aumento da concentração não levou a aumentos significativos da atividade e a presença de ésteres de sulfato é uma característica fundamental para que haja imunoestimulação.

4 - CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estudado o material polimérico presente nas águas da salina (água do tanque de entrada e do tanque de água concentrada), do sal que se formou pela ebulição das águas de salina (precipitado da água do tanque de entrada e precipitado da água do tanque de água concentrada) e do sal. A amostra proveniente do tanque de água concentrada (AC) apresentou o maior conteúdo de material polimérico (613,3 mg de MP/L), sendo a sua composição semelhante entre todas as amostras. Este material é composto maioritariamente por hidratos de carbono e por ésteres de sulfato.

A composição dos hidratos de carbono e a análise de ligações glicosídicas revelaram que o polissacarídeo predominante em todas as amostras foram as ulvanas, devido aos elevados níveis de ácidos urónicos e ramnose, assim como as ligações da Rha em (1→2) e sulfatação em C-3 e C-4. As fucoïdanas foram também um polissacarídeo predominante nas amostras, uma vez que a análise de composição dos hidratos de carbono apresentou elevados níveis de fucose, estando estes resíduos predominantemente em ligação (1→3), sulfatadas em C-2 ou C-4. As galactanas, identificadas pelo conteúdo em Gal em ligação (1→3) e (1→4) com sulfato em C-3 ou C-4, também se encontram presentes em todas as amostras. As glucanas também foram identificadas devido à presença de ligações (1→4) com sulfato em C-6. Devido à complexidade demonstrada pelas amostras, o fracionamento destas iria permitir determinar com exatidão as ligações entre os monossacarídeos bem como a posição das sulfatações.

O teste de imunoestimulação realizado à amostra proveniente do tanque de água concentrada indicou que o material polimérico contido nestes sais e águas apresenta potencial para ter atividade imunoestimuladora. Este teste permitiu ainda prever que o efeito está relacionado com os polissacarídeos sulfatados, sendo a presença de sulfatos um fator determinante. O fracionamento das amostras permitirá aprofundar o tipo de atividades biológicas que estes polissacarídeos poderão possuir, assim como permitir a determinação dos mecanismos de atuação.

Desta forma, a extração de polissacarídeos a partir do sal ou das águas das salinas pode ser vantajosa, quando comparada com a extração a partir de algas, dada a sua elevada disponibilidade, baixo custo e simplicidade na extração. A amostra AC, proveniente da água mais concentrada, mostrou ser a melhor fonte destes compostos. A elevada concentração de material polimérico no precipitado formado pelo aquecimento da água do tanque de água concentrada (336 mg/kg), revela que poderá se obtido sal rico em polissacarídeos sulfatados,

originando o desenvolvimento de um produto com efeitos benéficos para a saúde. A extração do material polimérico destas águas e posterior adição ao sal poderia também ser uma forma de o enriquecer em compostos com diversas atividades biológicas. Estes compostos, devido às suas propriedades, têm também potencial para ser utilizados em outras aplicações nas indústrias alimentar e farmacêutica.

5 – BIBLIOGRAFIA

- [1] Adaptado de: <http://saboresaberes.blogspot.pt/2013/05/parceria-com-rui-simeao-tavira.html#.U57B5PldVq0>. Acedido em 17/06/2014
- [2] <Http://en.wikipedia.org/wiki/Halite#mediaviewer/File:Selpologne.jpg>. Acedido em 17/06/2014
- [3] <http://www.glitztv.com.br/noticias-br/tendencias-da-alta-cozinha-sal-gourmet/>. Acedido em 25/06/2014.
- [4] Bravo-Linares CM, Mudge SM. Temporal trends and identification of the sources of volatile organic compounds in coastal seawater. *J Environ Monit* 2009;11:628–41.
- [5] Engel A, Händel N. A novel protocol for determining the concentration and composition of sugars in particulate and in high molecular weight dissolved organic matter (HMW-DOM) in seawater. *Mar Chem* 2011;127:180–91.
- [6] Meziane T, Bodineau L, Retiere C, Thoumelin G. The use of lipid markers to define sources of organic matter in sediment and food web of the intertidal salt-marsh-flat ecosystem of Mont-Saint-Michel Bay, France. *J Sea Res* 1997;38:47–58.
- [7] Simões MP, Calado ML, Madeira M, Gazarini LC. Decomposition and nutrient release in halophytes of a Mediterranean salt marsh. *Aquat Bot* 2011;94:119–26.
- [8] Kaçka A, Dönmez G. Isolation of *Dunaliella* spp. from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol. *Bioresour Technol* 2008;99:8348–52.
- [9] Donadio C, Bialecki A, Valla A, Dufossé L. Carotenoid-derived aroma compounds detected and identified in brines and speciality sea salts (fleur de sel) produced in solar salterns from Saint-Armel (France). *J Food Compos Anal* 2011;24:801–10.
- [10] Yoon J, Kang KH, Park Y. Moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *Int J Mol Sci* 2002;52:2043–8.
- [11] Evans W. Volatile organic chemicals of a shore-dwelling cyanobacterial mat community. *J Chem Ecol* 1994;20.
- [12] Albuquerque L, Tiago I, Rainey F a, Taborda M, Nobre MF, Veríssimo A, da costa MS. *Salirhabdus euzebyi* gen. nov., sp. nov., a Gram-positive, halotolerant bacterium isolated from a sea salt evaporation pond. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:1566–71.
- [13] Giani M, Berto D, Zangrando V, Castelli S, Sist P, Urbani R. Chemical characterization of different typologies of mucilaginous aggregates in the Northern Adriatic Sea. *Sci Total Environ* 2005;353:232–46.
- [14] Urbani R, Magaletti E, Sist P, Cicero AM. Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and

- Skeletonema costatum: effect of P-depletion and growth status. *Sci Total Environ* 2005;353:300–6.
- [15] Kim S-K, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J Funct Foods* 2010;2:1–9.
- [16] Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr Polym* 2011;84:14–21.
- [17] Silva IM. Análise da matéria orgânica associada ao sal marinho. Tese de doutoramento, Aveiro, 2014.
- [18] Alves A, Sousa R a., Reis RL. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *J Appl Phycol* 2012;25:407–24.
- [19] Ferreira LG, Nosedá MD, Gonçalves AG, Ducatti DRB, Fujii MT, Duarte MER. Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). *Carbohydr Res* 2012;347:83–94.
- [20] Araújo CA, Nosedá MD, Cipriani TR, Gonçalves AG, Duarte MER, Ducatti DRB. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. *Carbohydr Polym* 2013;91:483–91.
- [21] Silva FRF, Dore CMPG, Marques CT, Nascimento MS, Benevides NMB, Rocha H a. O, Chavante SF, Leite EL. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydr Polym* 2010;79:26–33.
- [22] Alban S, Schauerte A, Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides : Part I . Synthesis and structure ± activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydr Polym* 2002;47:267–76.
- [23] Yuan H, Song J, Zhang W, Li X, Li N, Gao X. Antioxidant activity and cytoprotective effect of kappa-carrageenan oligosaccharides and their different derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:1329–34.
- [24] Abad L V, Relleve LS, Racadio CDT, Aranilla CT, De la Rosa AM. Antioxidant activity potential of gamma irradiated carrageenan. *Appl Radiat Isot* 2013;79:73–9.
- [25] Pomin VH, Antônio P, Mourão DS. Structure versus anticoagulant and antithrombotic actions of marine sulfated polysaccharides. *Brazilian J Pharmacogn* 2008;22:921–8.
- [26] Fonseca RJC, Oliveira S-NMCG, Melo R, Pereira G, Benevides NMB, Mourão PAS. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. *Thromb Haemost* 2008;99:539–45.

- [27] Eccles R, Meier C, Jawad M, Weinmüller R, Grassauer A, Prieschl-grassauer E. Efficacy and safety of an antiviral Iota-Carrageenan nasal spray : a randomized , study in volunteers with early symptoms of the common cold. *Respir Res* 2010;11:1–11.
- [28] Kalitnik AA, Byankina Barabanova AO, Nagorskaya VP, Reunov A V., Glazunov VP, Solov'eva TF, Yermak IM. Low molecular weight derivatives of different carrageenan types and their antiviral activity. *J Appl Phycol* 2012;25:65–72.
- [29] Cáceres PJ, Carlucci MJ, Damonte EB, Matsuhira B, Zuñiga EA. Carrageenans from chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. *Phytochemistry* 2000;53:81–6.
- [30] Jolles B, Remington M, Andrews PS. Effects of sulphated degraded laminarin on experimental tumour growth. *Br J Cancer* 1963;17:109–15.
- [31] Hiroishi S, Sugie K, Yoshida T, Morimoto J, Taniguchi Y, Imai S, Kurebayashi J. Antitumor effects of *Marginisporium crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga. *Cancer Lett* 2001;167:145–50.
- [32] Zhou G, Sheng W, Yao W, Wang C. Effect of low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. *Pharmacol Res* 2006;53:129–34.
- [33] Hu X, Jiang X, Aubree E, Boulenger P, Critchley AT. Preparation and In Vivo . Antitumor Activity of κ -Carrageenan Oligosaccharides. *Pharm Biol* 2006;44:646–50.
- [34] Yuan H, Song J, Li X, Li N, Liu S. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of κ -carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. *J Appl Phycol* 2010;23:59–65.
- [35] Yuan H, Song J, Li X, Li N, Dai J. Immunomodulation and antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharides. *Cancer Lett* 2006;243:228–34.
- [36] Nacife VP, Soeiro MDNC, Gomes RN, D'Avila H, Castro-Faria Neto HC, Meirelles MDNL. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide in vivo. *Cell Struct Funct* 2004;29:27–34.
- [37] Souza BWS, Cerqueira MA, Bourbon AI, Pinheiro AC, Martins JT, Teixeira JA, Coimbra MA, Vicente AA. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocoll* 2012;27:287–92.
- [38] Kwon M-J, Nam T-J. Porphyran induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Sci* 2006;79:1956–62.
- [39] Kamenarska Z, Serkedjieva J, Najdenski H, Stefanov K, Tsvetkova I, Dimitrova-Konaklieva S, Popov S. Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea. *Bot Mar* 2009;52:80–6.

- [40] Duarte MER, Cauduro JP, Nosedá DG, Nosedá MD, Gonçalves AG, Pujol C a, Damonte EB, Cerezo AS. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydr Res* 2004;339:335–47.
- [41] Guerra-Rivas G, Gómez-Gutiérrez CM, Alarcón-Arteaga G, Soria-Mercado IE, Ayala-Sánchez NE. Screening for anticoagulant activity in marine algae from the Northwest Mexican Pacific coast. *J Appl Phycol* 2010;23:495–503.
- [42] Zhang Z, Zhang Q, Wang J, Song H, Zhang H, Niu X. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities in vitro. *Carbohydr Polym* 2010;79:1124–9.
- [43] Zúñiga EA, Matsuhiro B, Mejías E. Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. *Carbohydr Polym* 2006;66:208–15.
- [44] Cumashi A, Ushakova NA, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozevich E, Berman AE, Bilan MI, Usov AI, Ustyuzhanina NE, Grachev A, Sanderson CJ, Sanderson M, Rabinovich A, Iacobelli S.. A comparative study of the anti-inflammatory , anticoagulant , antiangiogenic , and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 2007;17:541–52.
- [45] Magalhaes KD, Costa LS, Fidelis GP, Oliveira RM, Nobre LTDB, Dantas-Santos N, Camara RBG, Albuquerque IVR, Cordeiro SL, Sabry DA, Costa MS, Santos P, Alves LG, Rocha HA. Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteris delicatula*. *Int J Mol Sci* 2011;12:3352–65.
- [46] Dore CMPG, das C Faustino Alves MG, Will LSEP, Costa TG, Sabry DA, de Souza Rêgo LAR, Augusto R, Accard CM, Rocha, Filgueira LGA, Leite ED.. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydr Polym* 2013;91:467–75.
- [47] Dias PF, Siqueira JM, Vendruscolo LF, Neiva TDJ, Gagliardi AR, Maraschin M, Ribeiro-do-Valle RM. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56:436–46.
- [48] Ye H, Wang K, Zhou C, Liu J, Zeng X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem* 2008;111:428–32.
- [49] Wang H, Chiu LCM, Ooi EC, Jr POA. A potent antitumor polysaccharide from the edible brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*. *Bot Mar* 2010;53:265–74.

- [50] Khotimchenko YS. Antitumor properties of nonstarch polysaccharides: Fucoidans and chitosans. *Russ J Mar Biol* 2010;36:321–30.
- [51] Vishchuk OS, Ermakova SP, Zvyagintseva TN. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydr Res* 2011;346:2769–76.
- [52] Adhikari U, Mateu CG, Chattopadhyay K, Pujol CA, Damonte EB, Ray B. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry* 2006;67:2474–82.
- [53] Elizondo-Gonzalez R, Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Mendoza-Gamboa E, Rodriguez-Padilla C, Trejo-Avila LM. In vitro characterization of the antiviral activity of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus. *Virology* 2012;9:307–17.
- [54] Wang H, Ooi EV, Ang PO. Antiviral polysaccharides isolated from Hong Kong brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*. *Sci China C Life Sci* 2007;50:611–8.
- [55] Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T. Antiviral Effect of Fucoidan Extracted from the Brown Seaweed , *Sargassum wightii* , on Shrimp *Penaeus monodon* Postlarvae against White Spot Syndrome Virus. *J World Aquac Soc* 2012;43:697–706.
- [56] Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S, Chattopadhyay K, Karmakar P, Ray B. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. *Food Chem* 2010;118:823–9.
- [57] Dore CMPG, das C Faustino Alves MG, Will LSEP, Costa TG, Sabry DA, de Souza Rêgo LAR, Augusto R, Accardo CM, Rocha HAO, Filgueira LGA, Leite EL. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydr Polym* 2013;91:467–75.
- [58] Siqueira RCL, Silva MSJ, de Alencar DB, Pires ADF, Alencar NMN De, Pereira MG, Cavada BS, Sampaio AH, Farias WRL, Assreuy AMS. In vivo anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. *Pharm Biol* 2011;49:167–74.
- [59] Leiro JM, Castro R, Arranz JA, Lamas J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Int Immunopharmacol* 2007;7:879–88.
- [60] Pengzhan Y. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacol Res* 2003;48:543–9.

- [61] Mao W-J, Fang F, Li H-Y, Qi X-H, Sun H-H, Chen Y, Guo S-D. Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*. *Carbohydr Polym* 2008;74:834–9.
- [62] Shao P, Chen X, Sun P. In vitro antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. *Int J Biol Macromol* 2013;62:155–61.
- [63] Li B, Liu S, Xing R, Li K, Li R, Qin Y, Wang X, Wei Z, Li P. Degradation of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities. *Carbohydr Polym* 2013;92:1991–6.
- [64] Qi H, Zhang Q, Zhao T, Chen R, Zhang H, Niu X, Li Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int J Biol Macromol* 2005;37:195–9.
- [65] Shao P, Chen M, Pei Y, Sun P. In vitro antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophyten seaweeds *Ulva fasciata*. *Int J Biol Macromol* 2013;59:295–300.
- [66] Lima MA, Romano-Lieber NS, Duarte AMRDC. Circulation of antibodies against yellow fever virus in a simian population in the area of Porto Primavera Hydroelectric Plant, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010;52:11–6.
- [67] Cassolato JEF, Nosedá MD, Pujol CA, Pellizzari FM, Damonte EB, Duarte MER. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohydr Res* 2008;343:3085–95.
- [68] Soares AR, Robaina MCS, Mendes S, Silva TSL, Gestinari LMS, Pamplona S, Yoneshigue-valentin Y, Kaiser CR, Teresa M, Romanos V. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Brazilian J Pharmacogn* 2012;22:714–23.
- [69] Necas J, Bartosikova L. Carrageenan : a review. *Vet Med (Praha)* 2013;2013:187–205.
- [70] van de Velde F, Lourenço ND, Pinheiro HM, Bakker M. Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques. *Adv Synth Catal* 2002;344:815–35.
- [71] Lai VMF, Wong PA-L, Lii C-Y. Effects of Cation Properties on Sol-gel Transition and Gel Properties of -carrageenan. *JFS Food Eng Phys Prop Eff* 2000;65:1332–7.
- [72] Barbeyron T, Michel G, Potin P, Henrissat B, Kloareg B. Iota-Carrageenases constitute a novel family of glycoside hydrolases, unrelated to that of kappa-carrageenases. *J Biol Chem* 2000;275:35499–505.

- [73] Lahaye M. Developments on gelling algal galactans , their structure and physico-chemistry. *J Appl Phycol* 2001;13:173–84.
- [74] Anderson NS, Dolan TCS, Laeson CJ, Penman A, Rees DA. Carrageenans - Part V. the masked repeating structures of λ and μ -carrageenans. *Carbohydr Res* 1968;7:468–73.
- [75] Estevez JM, Ciancia M, Cerezo AS. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. *Carbohydr Res* 2004;339:2575–92.
- [76] Michel A-S, Mestdagh MM, Axelos MAV. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. *Int J Biol Macromol* 1997;21:195 – 200.
- [77] Ruiters GA De, Rudolph B. Carrageenan biotechnology. *Trends Food Sci Technol* 1997;8:389–95.
- [78] Freile-Pelegrín Y, Azamar JA, Robledo D. Preliminary Characterization of Carrageenan from the Red Seaweed *Halymenia floresii*. *J Aquat Food Prod Technol* 2011;20:73–83.
- [79] Freile-Pelegrín Y, Robledo D. Carrageenan of *Euclima isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Nicaragua. *J Appl Phycol* 2007;20:537–41.
- [80] Freile-Pelegrín Y, Robledo D. Carrageenan of *Euclima isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. II. Seasonal variations in carrageenan and biochemical characteristics. *Bot Mar* 2006;49:72–8.
- [81] Freile-Pelegrín Y, Robledo D, Azamar JA. Carrageenan of *Euclima isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. I. Effect of extraction conditions. *Bot Mar* 2006;49:65–71.
- [82] Kumar S, Godiya CB, Siddhanta AK. Carrageenan from *Sarcocystis scinaoides* (Gigartinales , Rhodophyta) of Indian waters. *Carbohydr Polym* 2012;87:1657–62.
- [83] Franz G, Alban S. Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives. *Int J Biol Macromol* 1995;17:311–4.
- [84] Rocha de Souza MC, Marques CT, Guerra Dore CM, Ferreira da Silva FR, Oliveira Rocha HA, Leite EL. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phycol* 2007;19:153–60.
- [85] Zhang Q, Yu P, Li Z, Zhang H, Xu Z. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis*. *J Appl Phycol* 2003;15:305–10.
- [86] Lahaye M. Developments on gelling algal galactans , their structure and physico-chemistry. *J Appl Phycol* 2001;13:173–84.

- [87] Pomin VH. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review. *Glycoconj J* 2010;27:1–12.
- [88] Estevez JM, Ciancia M, Cerezo AS. The system of sulfated galactans from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* (Phyllophoraceae, Rhodophyta): Location and structural analysis. *Carbohydr Polym* 2008;73:594–605.
- [89] Duarte MER, Nosedá MD, Cardoso MA, Tulio S, Cerezo AS. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. *Carbohydr Res* 2002;337:1137–44.
- [90] Kolender AA, Matulewicz MC. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. *Carbohydr Res* 2002;337:57–68.
- [91] Miller IJ, Falshaw R, Furneaux RH. The Chemical Structures of Polysaccharides from New Zealand Members of the Rhodomelaceae. *Bot Mar* 1993;36:203–8.
- [92] Zhang Q, Qi H, Zhao T, Deslandes E, Ismaeli NM, Molloy F, Critchley AT. Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). *Carbohydr Res* 2005;340:2447–50.
- [93] Zhang Z, Zhang Q, Wang J, Zhang H, Niu X, Li P. Preparation of the different derivatives of the low-molecular-weight porphyran from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant activities in vitro. *Int J Biol Macromol* 2009;45:22–6.
- [94] Zhang Q, Li N, Liu X, Zhao Z, Li Z, Xu Z. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. *Carbohydr Res* 2004;339:105–11.
- [95] Morrice LM, McLean MW, Long WF, Williamson FB. Porphyran primary structure. *Hydrobiologia* 1984;116:572–5.
- [96] Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Zhang J, Li P. Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoïdan and their potential antioxidant activity in vitro. *Int J Biol Macromol* 2009;44:170–4.
- [97] Qi H, Zhao T, Zhang Q, Li Z, Zhao Z, Xing R. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *J Appl Phycol* 2006;17:527–34.
- [98] Zhang Q, Li N, Zhou G, Lu X, Xu Z, Li Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol Res* 2003;48:151–5.
- [99] Tako M. Rheological Characteristics of Fucoïdan Isolated from Commercially Cultured *Cladosiphon okamuranus*. *Bot Mar* 2003;46:461–5.

- [100] Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar Drugs* 2011;9:2106–30.
- [101] Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar Drugs* 2011;9:196–223.
- [102] Chevolut L, Mulloy B, Ratiskol J, Foucault A, Collic-Jouault S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr Res* 2001;330:529–35.
- [103] Pereira MS. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem* 1999;274:7656–67.
- [104] Anastyyuk SD, Shevchenko NM, Nazarenko EL, Dmitrenok PS, Zvyagintseva TN. Structural analysis of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* by MALDI-TOF and tandem ESI mass spectrometry. *Carbohydr Res* 2009;344:779–87.
- [105] Ushakova NA, Morozevich GE, Ustyuzhanina NE, Bilan MI, Usov AI, Nifantiev NE, Preobrazhenskaya ME. Anticoagulant activity of fucoidans from brown algae. *Biochem Suppl Ser B Biomed Chem* 2009;3:77–83.
- [106] Cristiane M, Souza R De, Marques CT, Maria C, Dore G, Roberto F, Alexandre H, Rocha O, Leite EL. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J Appl Phyco* 2007;19:153–60.
- [107] Rupérez P, Ahrazem O, Leal JA. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem* 2002;50:840–5.
- [108] Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Li Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol* 2008;42:127–32.
- [109] Camara RBG, Costa LS, Fidelis GP, Nobre LTDB, Dantas-Santos N, Cordeiro SL, Costa MS, Santos P, Alves LG, Rocha HAO. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. *Mar Drugs* 2011;9:124–38.
- [110] Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro SL, Oliveira RM, Sabry DA, Câmara RBG, Nobre LTDB, Costa MSSP, Almeida-Lima J, Farias EHC, Leite EL, Rocha HAO. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed Pharmacother* 2010;64:21–8.
- [111] Cumashi A, Ushakova N a, Preobrazhenskaya ME, D’Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari, N, Morozevich E, Berman AE, Bilan MI, Usov AI, Ustyuzhanina NE, Grachev

- A, Sanderson CJ, Kelly M, Rabinovich A, Iacobelli S.. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 2007;17:541–52.
- [112] Castro R, Piazzon MC, Zarra I, Leiro J, Noya M, Lamas J. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture* 2006;254:9–20.
- [113] Cluzet S, Torregrosa C, Jacquet C, Lafitte C, Fournier J, Mercier L. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant, Cell Environ* 2004;27:917 – 928.
- [114] Harada N, Maeda M. Chemical structure of antithrombin-active Rhamnan sulfate from *Monostrom nitidum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62:1647 – 1652.
- [115] Mao W, Zang X, Li Y, Zhang H. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *J Appl Phycol* 2006;18:9–14.
- [116] Quemener B, Lahaye M. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. *J Appl Phycol* 1997;9:179–88.
- [117] Lahaye M, Axelos MAV. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.). *Carbohydr Polym* 1993;22:261–5.
- [118] Robic A, Sassi J-F, Dion P, Lerat Y, Lahaye M. Seasonal Variability of Physicochemical and Rheological Properties of Ulvan in Two *Ulva* Species (Chlorophyta) From the Brittany Coast1. *J Phycol* 2009;45:962–73.
- [119] Robic A, Gaillard C, Sassi J-F, Lerat Y, Lahaye M. Ultrastructure of ulvan: a polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers* 2009;91:652–64.
- [120] Conrad HE. The acid lability of the glycosidic bonds of L-iduronic acid residues in glycosaminoglycans. *Biochem J* 1980;191:355–63.
- [121] Ovodov YS. The chemistry of glycuronoglycans. Plenum Publ Corp 1975;3:319–31.
- [122] Costa C, Alves A, Pinto PR, Sousa RA, Borges da Silva EA, Reis RL, Rodrigues AE. Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydr Polym* 2012;88:537–46.
- [123] Mckinnell BJP, Percival E, Powell H. Structural Investigations on the Water-soluble Polysaccharide of the Green Seaweed *Enteromorpha compressa*. *Biochem J* 1961;80:43–51.
- [124] Ray B, Lahaye M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva* “rigida” (*Ulvales* , *Chlorophyta*). Chemical structure of ulvan. *Carbohydr Res* 1995;274:313–8.

- [125] Ray B, Lahaye M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva* “rigida” (ulvales, chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydr Res* 1995;274:251–61.
- [126] Percival E, Wold JK. The Acid Polysaccharide from the Green Seaweed *Ulva lactuca*. Part II. The Site of the Ester Sulphate. *J Chem Soc* 1963:5459–68.
- [127] Shanmugam M, Mody KH. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Curr Sci* 2000;79.
- [128] Melo FR, Pereira MS, Foguel D, Mourão PAS. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *J Biol Chem* 2004;279:20824–35.
- [129] Zhang H, Mao W, Fang F, Li H, Sun H, Chen Y, Qi X. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydr Polym* 2008;71:428–34.
- [130] Stevenson T, Furneaux H. Chemical methods from red algae for the analysis of sulphated galactans. *Carbohydr Res* 1991;210:277–98.
- [131] Coimbra M, Delgadillo I, Waldron K, Selvendran R. Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp. In: Linskens H, Jackson J, editors. *Plant Cell Wall Anal. SE - 2*, vol. 17, Springer Berlin Heidelberg; 1996, p. 19–44.
- [132] Dodgson KS, Price RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 1962;84:106–10.
- [133] Krohn RI. The Colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*, John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
- [134] Stone BA. An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides 1984;127:59–73.
- [135] Ciucanu L, Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res* 1984;131:209–17.
- [136] Miller IJ, Blunt JW. Desulfation of algal galactans. *Carbohydr Res* 1998;309:39–43.
- [137] Passos CP, Cepeda MR, Ferreira SS, Nunes FM, Evtuguin D V., Madureira P, Vilanova M, Coimbra MA.. Influence of molecular weight on in vitro immunostimulatory properties of instant coffee. *Food Chem* 2014;161:60–6.
- [138] Anastasakis K, Ross AB, Jones JM. Pyrolysis behaviour of the main carbohydrates of brown macro-algae. *Fuel* 2011;90:598–607.
- [139] Ray B. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. *Carbohydr Polym* 2006;66:408–16.

- [140] Alves A, Sousa RA, Reis RL. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *J Appl Phycol* 2012;25:407–24.
- [141] Marais MF, Joseleau JP. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr Res* 2001;336:155–9.
- [142] Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SM, McDowell RA, Shashkov AS, Nifant'ev NE, Khatuntseva EA, Usov AI. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res* 1999;320:108–19.
- [143] Pereira MS, Mulloy B, Mourão AS, Moura PAS. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans : comparison between the regular , repetitive , and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem* 1999;274:7656–67.
- [144] Kolender AA, Matulewicz MC. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. *Carbohydr Res* 2002;337:57–68.
- [145] Jin W, Zhang W, Wang J, Ren S, Song N, Duan D, Zhang Q. Characterization of laminaran and a highly sulfated polysaccharide from *Sargassum fusiforme*. *Carbohydr Res* 2014;385:58–64.
- [146] Lechat H, Amat M, Mazoyer J, Buléon A, Lahaye M. Structure and distribution of glucomannan and sulfated glucan in the cell walls of the red alga *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) 2000;902:891–902.
- [147] Cimino P, Bifulco G, Casapullo A, Bruno I, Gomez-Paloma L, Riccio R. Isolation and NMR characterization of rosacellose, a novel sulfated polysaccharide from the sponge *Mixyilla rosacea*. *Carbohydr Res* 2001;334:39–47.
- [148] Pérez Recalde M, Nosedá MD, Pujol CA, Carlucci MJ, Matulewicz MC. Sulfated mannans from the red seaweed *Nemalion helminthoides* of the South Atlantic. *Phytochemistry* 2009;70:1062–8.
- [149] Nishide E, Anzai H, Uchida N, Nisizawa K. Sugar constituents of fucose-containing polysaccharides from various Japanese brown algae 1990;204:573–6.
- [150] Na YS, Kim WJ, Kim SM, Park JK, Lee SM, Kim SO, Synytsya A, Park YI.. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. *Int Immunopharmacol* 2010;10:364–70.
- [151] Wang W, Wang S-X, Guan H-S. The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview. *Mar Drugs* 2012;10:2795–816.
- [152] Ngo D-N, Kim M-M, Kim S-K. Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. *Carbohydr Polym* 2008;74:228–34.

- [153] Ravi Kumar MN. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym* 2000;46:1–27.
- [154] Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J Surg Res* 2006;133:185–92.
- [155] Wongprasert K, Rudtanatip T, Praiboon J. Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *Fish Shellfish Immunol* 2014;36:52–60.
- [156] Maeda R, Ida T, Ihara H, Sakamoto T. Immunostimulatory Activity of Polysaccharides Isolated from *Caulerpa lentillifera* on Macrophage Cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2014;76:501–5.
- [157] Kim M-H, Joo H-G. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunol Lett* 2008;115:138–43.
- [158] Nakano K, Kim D, Jiang Z, Ueno M, Okimura T, Yamaguchi K, Oda T. Immunostimulatory Activities of the Sulfated Polysaccharide Ascophyllan from *Ascophyllum nodosum* in in Vivo and in Vitro Systems. *Biosci Biotechnol Biochem* 2014;76:1573–6.
- [159] Adaptado de: <https://www.google.pt/maps/@40.628867,-8.6609712,346m/data=!3m1!1e3>. Acedido em 30/06/2014