



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO ULVANO E SEUS DERIVADOS

Por

Guilherme André Miranda Ribeiro

Julho de 2012



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO ULVANO E SEUS DERIVADOS

FUNCTIONAL PROPERTIES OF ULVAN AND ITS DERIVATIVES

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

por

Guilherme André Miranda Ribeiro

Local: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Prof. Doutora Ana Maria Pereira Gomes e Doutora Ana Paula Santos Carvalho

Julho de 2012

Resumo:

A investigação científica tem vindo a dar cada vez mais importância aos polímeros naturais, devido à sua versatilidade a nível de propriedades, variabilidade, menor impacto ambiental e redução de custos. De entre estes polímeros, destacam-se os polissacarídeos devido às suas propriedades funcionais únicas e enorme diversidade encontrada na Natureza.

As algas marinhas são uma fonte privilegiada de polissacarídeos que são constituídos por uma gama de moléculas, como açúcares raros e grupos sulfato, que devido à sua elevada biodisponibilidade lhes confere uma gama de propriedades extremamente alargada. De entre estas propriedades, destacam-se a actividade anticoagulante, antihiperlipidémica, antioxidante, antiproliferativa, antiviral, antihipertensora, imunomoduladora e biomédica, assim como aplicações tecnológicas a nível ambiental, entre outras.

Entre as algas marinhas, destacam-se as algas verdes, e em particular as pertencentes à ordem *Ulvales*, cujo polissacarídeo predominante se denomina ulvano e que só agora começa a ter um maior relevo na investigação científica, mas que já começa a demonstrar o enorme leque de propriedades que se estima ter.

Este estudo tem como objectivo principal a revisão bibliográfica da literatura científica tendo em vista alargar o conhecimento sobre o ulvano, apresentar evidências das suas propriedades e inferir sobre novas funcionalidades, tanto através de uma análise comparativa com polissacarídeos semelhantes a nível físico-químico, como através de modificações ao polímero na forma nativa, nomeadamente a hidrólise; dado que noutros casos os oligossacrídeos já demonstraram uma potenciação das propriedades existentes, e eventualmente novas capacidades. Num segundo momento, foi realizada uma prospecção de mercado no Concelho do Porto com o objectivo de averiguar a existência e diversidade de produtos à base de macroalgas e, em última instância, de produtos contendo ulvano ou seus derivados.

A análise detalhada da literatura permitiu afirmar que o ulvano é um polissacarídeo muito promissor a nível biológico e tecnológico, embora a nível físico-químico a sua estrutura ainda não seja totalmente conhecida e, conseqüentemente, o mesmo se aplica aos mecanismos relacionados com as suas propriedades. Fica também claro o aumento de potencial que as modificações à molécula original, nomeadamente a hidrólise, podem originar; embora mais estudos sejam necessários. No que concerne à prospecção do mercado, não foi possível encontrar produtos à base de ulvano, mas a diversidade de produtos contendo macroalgas encontrada permite concluir que se está na presença de um nicho de mercado em expansão e que o ulvano pode certamente ter o seu lugar dadas as suas propriedades únicas.

Abstract:

Scientific research has been giving more and more importance to natural polymers, due to their versatility in terms of properties, variability, reduced environmental impact and reduced costs. Among these polymers, polysaccharides stand out due to their unique functional properties and enormous diversity found in nature.

Seaweeds are a privileged source of polysaccharides which are composed of a vast range of molecules, such as rare sugars and sulphate groups, which due to their high bioavailability; give them an extremely broad range of properties. Among these properties, it is possible to highlight the anticoagulant, antihyperlipidemic, antioxidant, antiproliferative, antiviral, antihypertensive and immunomodulatory activities, and biomedical applications, as well as technological and environmental characteristics, among others.

Green algae stand out among the different types of seaweeds, and in particular those belonging to the order *Ulvales*, in which the dominant polysaccharide that is found is called ulvan, and although its greater importance in scientific research is very recent, it already begins to demonstrate the wide range of estimated properties.

The main goal of this study is an extensive review of the scientific literature in order to deepen existing knowledge on ulvan, to present evidence of their properties and to infer about new functionalities; both through a comparative analysis with similar polysaccharides on a physico-chemical level, as well as via modifications to the native form of the polymer, in particular via hydrolysis. In fact, many studied oligosaccharides have demonstrated an enhancement of their existing properties (associated with polysaccharides from which they derive) and possibly the appearance of new ones. A second objective of this study was to carry out a market survey in the municipality of Porto with the aim of verifying the existence and diversity of products based on seaweeds and, ultimately, of the ones containing ulvan and its derivatives.

Detailed analysis of the literature allowed demonstrating that ulvan is a polysaccharide with very promising biological and technological properties, although its physico-chemical structure is not fully understood, and consequently the same applies to the mechanisms underlying its properties. It is also clear that, in order to increase the potential of the native polymer, some modifications could be applied, mainly hydrolysis, but further studies are required. Regarding the market survey, it was not possible to find ulvan containing products, but the diversity of products containing seaweeds that was found suggest the presence of an expanding market niche, in which ulvan can certainly have its place due to its unique properties.

Estrutura da Dissertação

A dissertação encontra-se dividida em seis secções conforme o diagrama a seguir apresentado (Figura 1).

Na primeira secção, a Introdução, efectua-se um enquadramento do tema elencando os objectivos do trabalho e descrevendo a metodologia usada para a elaboração do trabalho monográfico. Em seguida, nos capítulos II, III e IV, são aprofundados os métodos de obtenção e caracterização do ulvano, as suas propriedades funcionais – biológicas e tecnológicas, e as possíveis estratégias para formação de oligossacarídeos de ulvano com conseqüente impacto nas propriedades funcionais, respectivamente. O capítulo V reporta o levantamento do mercado e a análise associada do mesmo. Por fim, na última secção são indicadas algumas considerações finais sobre o tema e algumas sugestões para trabalhos futuro.

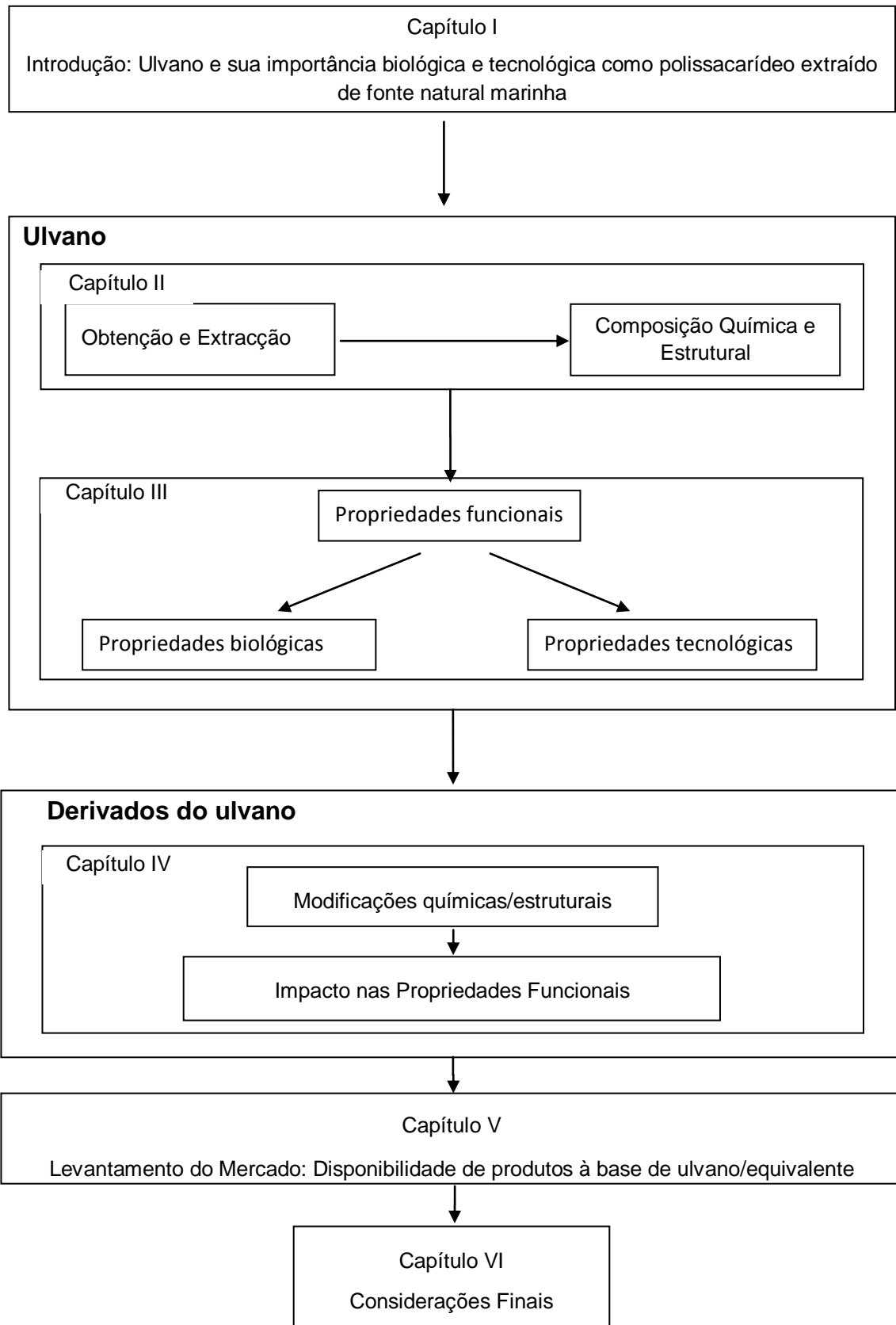


Figura 1. Diagrama do trabalho realizado no âmbito da dissertação.

Agradecimentos:

- À minha família e amigos, que sempre me apoiaram em todas as ocasiões, e me encorajaram na elaboração deste trabalho;
- A todos os professores directamente envolvidos com este trabalho, que me providenciaram sempre todo o apoio, tanto no aspecto técnico-científico, como humano; durante a elaboração desta monografia;
- A todos as restantes pessoas que, directa ou indirectamente, me ajudaram e aconselharam ao longo de toda a carreira académica, e que seria impossível enumerar.

Índice:

- Resumo	v
- Abstract	vii
- Estrutura da Dissertação	ix
- Agradecimentos	xi
- Lista de figuras	xv
- Lista de tabelas	xvii
- Introdução	1
- Capítulo II – Obtenção e Caracterização do Ulvano	8
➤ 2.1. – Obtenção e Extração	8
➤ 2.2. – Composição Química e Estrutural	11
- Capítulo III – Propriedades Funcionais do Ulvano	17
➤ 3.1. – Propriedades Biológicas	17
• 3.1.1. – Actividade Antioxidante	17
• 3.1.2. – Actividade Antiproliferativa/Anticarcinogénica	19
• 3.1.3. – Actividade Antiviral	20
• 3.1.4. – Actividade Anticoagulante	22
• 3.1.5. – Actividade Antihipeelipidémica/Antihipersolesterolémica	24
• 3.1.6. – Actividade Antihipertensora	26
• 3.1.7. – Actividade Imunomoduladora	29
• 3.1.8. – Aplicações Biomédicas	31
➤ 3.2. – Propriedades Tecnológicas	33
• 3.2.1. – Potencial de bioadsorção de metais pesados	33
• 3.2.2. – Utilização em técnicas de melhoramento de culturas vegetais	35
• 3.2.3. – Aplicações Ambientais	38
• 3.2.4. – Outras Aplicações	39
- Capítulo IV – O Ulvano e os seus Derivados	41
➤ 4.1. – Estratégias de Modificação	41
• 4.1.1. – Hidrólise	41
▪ 4.1.1.1. – Métodos Físicos	41
▪ 4.1.1.2. – Métodos Químicos	42
▪ 4.1.1.3. – Métodos Enzimáticos	42
	xiii

• 4.1.2. – Modificação Química por Adição de Grupos Iônicos	44
➤ 4.2. – Impacto nas Propriedades Funcionais	45
• 4.2.1. – Actividade Antioxidante	45
• 4.2.2. – Actividade Antiproliferativa/Anticarcinogénica	46
• 4.2.3. – Actividade Antiviral	46
• 4.2.4. – Actividade Antihipeelipidémica/Antihipersolesterolémica	46
• 4.2.5. – Actividade Prebiótica	48
• 4.2.6. - Utilização em técnicas de melhoramento de culturas vegetais	50
- Capítulo V – Pesquisa de Mercado	51
- Considerações Finais	53
- Referências Bibliográfica	55

Lista de Figuras:

- Figura 1 - Diagrama do trabalho realizado no âmbito da dissertação	x
- Figura 1.1. - Quantidade de referências encontradas pela palavra-chave “ulvan” ao longo das últimas décadas	4
- Figura 1.2. - Quantidade de artigos específicos sobre o ulvano ao longo das últimas décadas	5
- Figura 1.3. - Percentagens correspondentes aos diferentes temas nos artigos selecionados	6
- Figura 2.1. Processo de purificação do ulvano de acordo com Costa <i>et al.</i> , 2012	10
- Figura 2.2. Representação estrutural das unidades repetitivas do ulvano [Jiao <i>et al.</i> , 2011]	12
- Figura 3.1. Vias de coagulação [Adaptada de Pallister e Watson, 2010]	23
- Figura 3.2. Ilustração do Sistema renina-angiotensina-aldosterona [Adaptada de Boron e Boulpaep, 2005]	27
- Figura 3.3. Procedimento de determinação de actividade de inibição da ECA de acordo com o Método de Cushman e Cheung [Wu <i>et al.</i> , 2002]	28
- Figura 3.4. Processo de patogénese do fungo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	36
- Figura 4.1. Hidrólise do ulvano segundo Yu <i>et al.</i> , 2003	41

Lista de Tabelas:

- Tabela 2.1. Quadro-resumo referente aos diferentes processos de obtenção e extração do Ulvano 9
- Tabela 2.2. Resumo dos principais métodos analíticos utilizados na caracterização do ulvano e suas aplicações 13-15
- Tabela 3.1. Metodologias de estudo de actividade antioxidante do ulvano (adaptada de Prior *et al.*, 2005) 18
- Tabela 3.2. Ensaio efectuado por Leiro *et al.*, 2007 para análise de actividade imunomoduladora do ulvano 30
- Tabela 5.1. Quadro-resumo do levantamento de mercado efectuado no Concelho do Porto 51

Introdução:

Os polímeros naturais têm vindo, com o passar dos anos, a adquirir uma relevância cada vez maior a nível das suas propriedades funcionais, dada a sua enorme versatilidade e também diversidade. Posto isto, a investigação científica tem-se direccionado cada vez mais no sentido de aprofundar mais a pesquisa sobre estes compostos, em oposição á pesquisa de compostos obtidos por síntese química, não só devido às propriedades acima referidas, como também pelo facto de os polímeros naturais ou derivados serem biodegradáveis, em oposição aos primeiros, que muitas vezes são derivados do petróleo – a tendência actual a todos os níveis é a pesquisa de materiais renováveis, pouco ou nada poluentes e cuja obtenção possa ser sustentável a nível ambiental. A já referida versatilidade e diversidade aumenta imenso as hipóteses de descoberta de novas propriedades, o que só por si representa um contributo inestimável destes compostos [Alves *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2012, Wijesekara *et al.*, 2011; Yaich *et al.*, 2011].

De entre os polímeros naturais, destacam-se os polissacarídeos, devido às suas propriedades estruturais e funcionais únicas, as já referidas diversidade – continuamente há referências na literatura científica da descoberta de novos polissacarídeos – e versatilidade, tudo isto combinado torna estes polímeros talvez nos mais promissores, tanto a nível das ciências biológicas como no campo técnico-industrial. Há que acrescentar que os polissacarídeos podem ser utilizados na sua forma nativa, hidrolisados ou modificados, tudo isto influenciado por um sem número de variáveis, que multiplica a gama de aplicações para as quais os referidos polímeros podem vir a ser utilizados [Alves *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2010, Fer *et al.*, 2012; Robic *et al.*, 2008; Wijesekara *et al.*, 2011].

Das inúmeras fontes de obtenção de polissacarídeos naturais, os organismos marinhos e, em particular as macroalgas, têm adquirido uma importância cada vez maior devido às propriedades únicas dos microrganismos que nelas se encontram. As macroalgas estão taxonomicamente classificadas em várias Divisões, das quais as principais são as seguintes: *Chlorophyta*, *Phaeophyta* e *Rhodophyta*. [Alves *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010, Guiry *et al.*, 2012, *AlgaeBase*; Karnjanapratum *et al.*, 2011; MACOI, 2008; Ngo *et al.*, 2011; Stengel *et al.*, 2011; Toskas *et al.*, 2011; Wijesekara *et al.*, 2011].

A Divisão *Chlorophyta* engloba a grande maioria das algas verdes, que só nos últimos anos se tornaram um alvo particular na investigação científica, muito devido ao grave problema ambiental que representa a eutrofização, isto é, o crescimento desmesurado de espécies destas algas, e conseqüente formação de massas em zonas costeiras, lagos, etc. A proliferação destas massas de algas (nomeadamente de *Ulva* sp., pertencente à Ordem dos *Ulvales*) resulta da contaminação das águas por vários compostos químicos, como por exemplo adubos agrícolas e outros compostos ricos em fósforo e azoto, que originam um excedente nutricional que favorece o crescimento das algas. Por sua vez, as algas, como seres fotossintéticos, alteram o balanço dos gases dissolvidos na água, levando à morte de peixes e

outras espécies, causando danos graves no ecossistema. De notar que a acumulação nas costas destas massas de algas é também um problema ambiental devido à sua degradação anaeróbia, que origina mau cheiro (principalmente resultante da produção de gases de enxofre resultantes do elevado teor em sulfatos que a alga contém) e consequentemente intoxicações por inalação crónica (alguns gases, como o gás sulfídrico, são tóxicos), além de ser um problema a nível de gestão de resíduos. Assim, este recurso natural pode ser facilmente estudado e a exploração das algas verdes torna-se mais benéfica, não só devido às suas propriedades como também ao excedente presente na natureza [Alves *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2012; Bruhn *et al.*, 2011, Collén *et al.*, 2011; Lahaye *et al.*, 2007, Paradossi *et al.*, 1999; Peu *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006, Robic *et al.*, 2008; Stengel *et al.*, 2011; Toskas *et al.*, 2011; Yaich *et al.*, 2011].

A designação dada ao principal componente polisacárido das espécies pertencentes à Ordem dos *Ulvales*, nomeadamente à Família *Ulveaceae*, é **Ulvano**. Esta Família é composta essencialmente por dois géneros, *Ulva* e *Enteromorpha*, e as várias espécies que a compõem são designadas pelo nome comum de “alface do mar”. É de salientar que, a nível taxonómico, existe alguma dificuldade na caracterização destas espécies [Lahaye *et al.*, 2007]. Os polissacárideos que compõem estas algas podem ser classificados de várias formas, mas segundo Lahaye *et al.*, 2007; pode dividir-se o conjunto de polissacárideos entre os que estão presentes em larga escala e em pequena escala. Entre os presentes em pequena escala, encontram-se as glucoronanas [El Boutachfai *et al.*, 2011] e as xiloglucanas lineares, solúveis em bases, enquanto os presentes em larga escala se classificam consoante a sua solubilidade em água – a fracção insolúvel é a celulose, enquanto o ulvano compõe a fracção solúvel. O nome *Ulvano* deriva dos termos *ulvino* e *ulvacina*, introduzidos por Kylin em 1946; para designar as diferentes fracções de polissacárideos sulfatados hidrossolúveis presentes na alga *Ulva lactuca*. Actualmente, o termo *Ulvano* é utilizado para designar todos os polissacárideos sulfatados hidrossolúveis provenientes da Ordem dos *Ulvales* [Collén *et al.*, 2011; Lahaye *et al.*, 2007; Robic *et al.*, 2008].

As algas pertencentes à Ordem dos *Ulvales* destacam-se por possuir vários compostos bioactivos, tais como os compostos fenólicos e os polissacárideos sulfatados. Estes últimos, nos quais se inclui o Ulvano, pertencem a um grupo de moléculas bastante complexo, que ocorrem numa vasta gama de organismos, sendo que as macroalgas marinhas representam a principal fonte não-animal [Costa *et al.*, 2010; El-Baky *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2006, Stengel *et al.*, 2011; Wijesekara *et al.*, 2011].

O Ulvano (que representa aproximadamente 8-29 % do peso seco do extracto de *Ulva* sp.) é um heteropolissacárideo; presente na parede celular destas algas, fortemente associado a proteínas, composto por vários monossacárideos, dos quais se destacam as ramnose e xilose, o ácido idurónico e o ácido glucurónico, mas também possui grupos sulfato [Alves *et al.*, 2010; Collén *et al.*, 2011; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye *et al.*, 1998; Paradossi *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 2006; Robic *et al.*, 2008; Toskas *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2003]. A

presença destes confere um interesse acrescido a este polímero, e é determinante para muitas das propriedades em estudo, pois os polissacarídeos sulfatados apresentam uma actividade promissora numa vasta gama de utilizações, tais como anti-carcinogénica, anti-proliferativa, antiviral, antioxidante, antihiperlipidémica, antihipertensora, antiadesiva, antiinflamatória e anticoagulante, entre outras [Collén *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2010; El-Baky *et al.*, 2009; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Lahaye *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2006; Ngo *et al.*, 2011; Paulert, 2005; Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2012; Sathivel *et al.*, 2008; Stengel *et al.*, 2011; Toskas *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010]. Contudo, o interesse nas algas desta Família e, em particular, do género *Ulva*, não se direcciona unicamente para o Ulvano. As espécies deste género são ricas em vários nutrientes, dos quais se destacam hidratos de carbono, fibras, minerais (ex.: zinco, ferro), vitaminas (ex.: B1, B9, C, E), proteínas e aminoácidos: em consequência, desde tempos remotos que são utilizadas na medicina tradicional chinesa para combater a hiperlipidemia, insolação e doenças urinárias, entre outras [El-Baky *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2006; Ngo *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2012; Sathivel *et al.*, 2008; Toskas *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2003].

Actualmente, procede-se também à sua utilização como suplemento nutricional devido aos nutrientes acima enumerados, assim como ao seu baixo valor calórico e teor em lípidos, tal como vem sendo usado há muitos anos na cozinha japonesa. Além disso, a ampla distribuição e grande quantidade em que estas algas se encontram permitem que também sejam atractivas para utilização em tratamentos de águas e eventualmente conversão em biogás. Tudo isto confere à família *Ulvaceae* um grande potencial nutricional, farmacológico, tecnológico e agrícola [Alves *et al.*; 2010, Alves *et al.*, 2012; Brownlee, 2011; Bruhn *et al.*, 2011; Collén *et al.*, 2011; El-Baky *et al.*, 2009; El Modafar *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*; 2007; Ngo *et al.*, 2011; Paulert, 2005; Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006; Qi *et al.*; 2012; Stengel *et al.*, 2011; Toskas *et al.*, 2011; Wijesekara *et al.*, 2011; Yaich *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2003].

De momento, ainda não se conhece com exactidão ao que se devem as inúmeras propriedades bioquímicas que este composto evidencia, mas os estudos experimentais até agora realizados demonstram que estas resultam de um conjunto de características estruturais presentes nos polissacarídeos sulfatados, entre os quais se inclui a formação de *clusters* de grupos sulfato, que asseguram a interacção com proteínas catiónicas. Está também descrita a importância do peso molecular, do teor em sulfatos e de ácidos urónicos do polímero, posição dos respectivos grupos, tipos de açúcares presentes, existência de ramificações glicosídicas e presença de outros grupos funcionais [Alves *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2010; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Lahaye *et al.*, 1996; Lahaye *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2012; Stengel *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010. Wijesekara *et al.*, 2011].

Uma componente bastante importante deste trabalho foi a pesquisa em larga escala e revisão de todos os artigos relacionados com o ulvano, por forma a apresentar um ponto de situação relativamente ao interesse geral que este polissacarídeo tem despertado na comunidade científica, e também em que áreas é que se verifica maior incidência dos estudos.

A pesquisa para a elaboração desta tese recorreu a várias fontes, tanto em formato *online* como em papel, mas para fazer esta avaliação da incidência do ulvano nas publicações científicas, recorreu-se à base de dados de artigos científicos *www.sciencedirect.com*. e *www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/*. Para a elaboração da pesquisa, usou-se a palavra-chave “ulvan” em todos os campos, à excepção dos autores, o que permitiu a elaboração do gráfico representado na Figura 1.1:

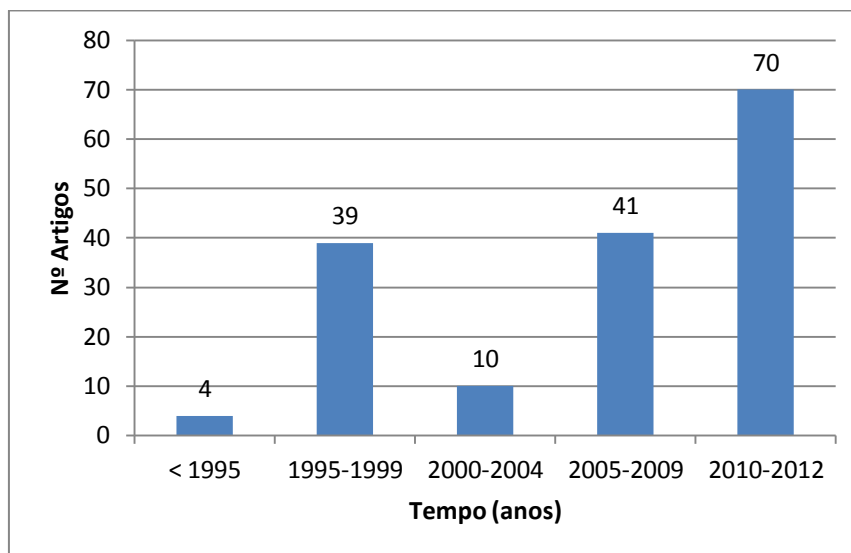


Figura 1.1. Quantidade de referências encontradas pela palavra-chave “ulvan” ao longo das últimas décadas.

Embora a análise deste gráfico evidencie de imediato um crescimento cerca de dez vezes superior das referências ao ulvano na literatura científica desde 1995, e em particular um incremento claro desde 2010 em que o número de artigos quase que duplicou; uma análise mais detalhada a todas estas referências permite excluir um grande número de artigos, em que o ulvano aparece apenas como título de uma entrada na bibliografia ou é referido no corpo do texto mas sem particular relevo. A exclusão destas referências reduz substancialmente o número de artigos, tal como se pode observar na Figura 1.2:

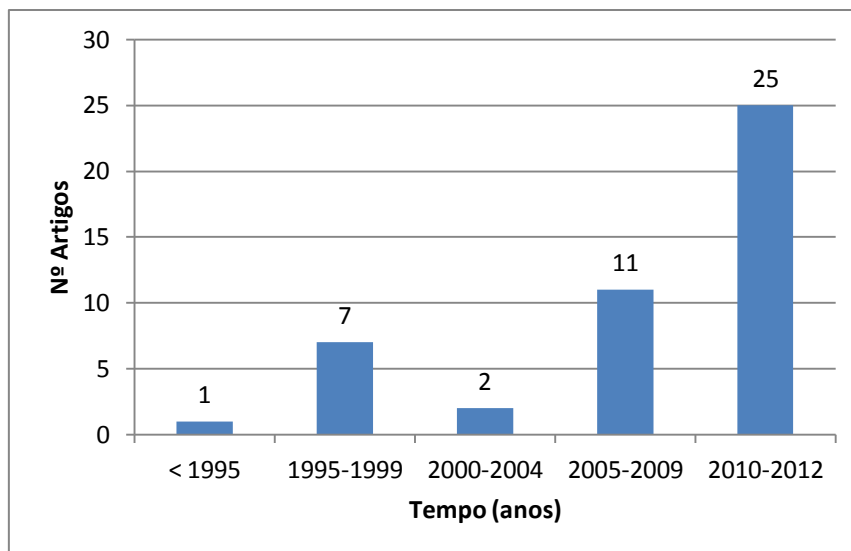


Figura 1.2. Quantidade de artigos específicos sobre o ulvano ao longo das últimas décadas.

Enquanto no gráfico correspondente à Figura 1.1 se contabiliza um total de 164 referências, apenas 46 são contabilizados para a elaboração do segundo gráfico, isto é, de todos os artigos encontrados, apenas 28% se concentram especificamente no ulvano. Contudo, verifica-se a mesma tendência quanto à evolução do número de artigos. Os primeiros trabalhos de investigação com particular incidência no ulvano apareceram em meados de anos 90, o que se verifica pela quantidade de artigos encontrada no período de 1995 a 1999 e, conseqüentemente, a sua utilização como referência bibliográfica em trabalhos sobre compostos com propriedades similares, tais como outros polissacarídeos sulfatados, origina o elevado valor obtido na Figura 1.1. A partir de meados da primeira década do século XXI, o interesse no ulvano tornou-se claramente mais nítido, dado que os trabalhos de pesquisa sobre a sua obtenção, caracterização e propriedades revelaram resultados bastante promissores, o que se traduz no incremento gradual do número de artigos sobre o ulvano a partir de 2005, e em particular desde 2010, verificando-se neste último período de tempo (de 2010 até 30/06/2012) um aumento enorme (superior ao dobro do número de artigos) tanto do número de referências como do número de artigos propriamente ditos.

É também relevante analisar as diferentes temáticas das pesquisas sobre o ulvano, o que pode ser feito com recurso ao gráfico da Figura 1.3:

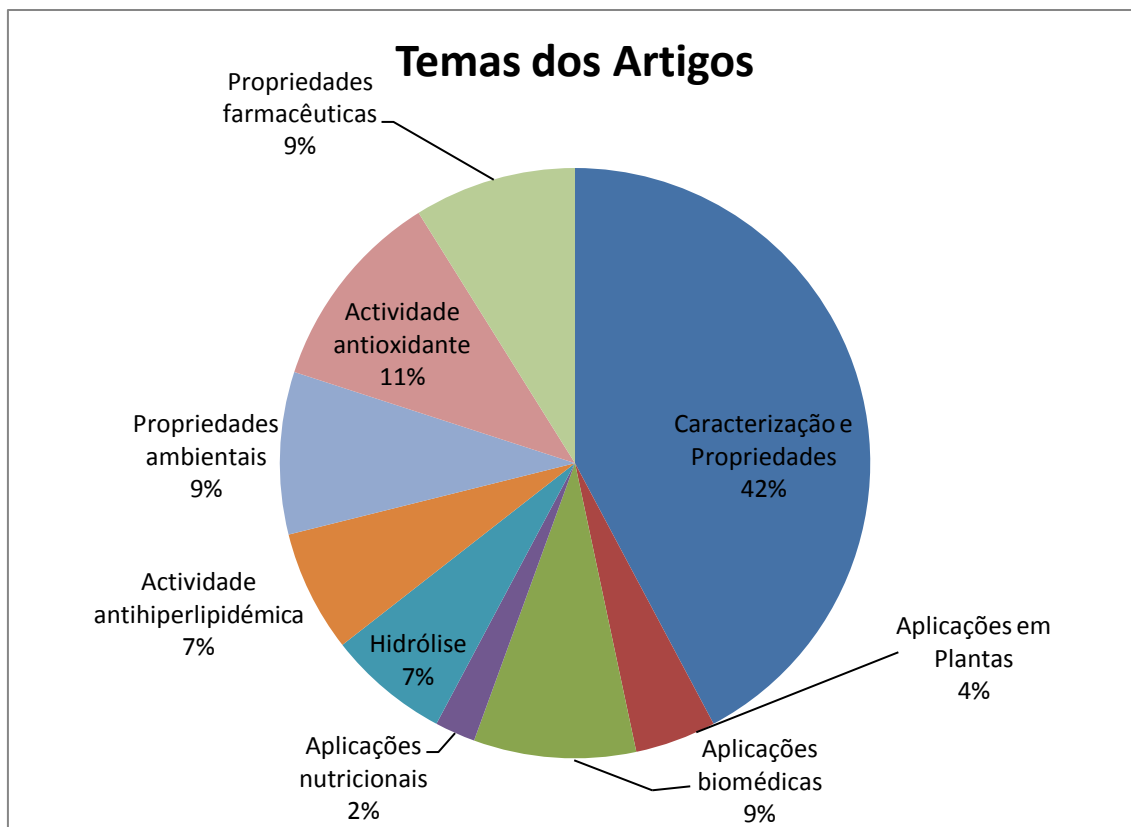


Figura 1.3. Percentagens correspondentes aos diferentes temas nos artigos seleccionados.

Analisando o principal objectivo de investigação nos artigos sobre o ulvano, torna-se de imediato evidente que o tema predominante é a caracterização da molécula de ulvano e um estudo genérico sobre as suas muitas potencialidades. Este tipo de artigos são encontrados ao longo dos anos, com particular incidência nos primeiros anos após a descoberta e o despertar do interesse pela molécula, mas ainda aparecem nas pesquisas em número razoável porque, tal como referido anteriormente nesta introdução, ainda há um longo caminho a percorrer para se chegar a uma caracterização físico-química detalhada, assim como na análise das promissoras potencialidades deste polissacarídeo. A partir de 2003, começam a aparecer artigos mais direccionados para um objectivo, como por exemplo a actividade antihiperlipidémica/antihipercolesterolémica, que foi uma das primeiras a receber particular atenção o que não é surpresa tendo em conta que sendo um polissacarídeo poderá esperar-se propriedades fisiológicas semelhantes à das fibras. Outras áreas que têm registado um aumento de interesse nos últimos anos são as propriedades farmacêuticas no geral (ex: anticoagulante, antineoplásica), as aplicações biomédicas e as possibilidades de hidrólise, em particular, sendo que este último tema é referido anteriormente também devido à sua eventual capacidade para potenciar as propriedades do polissacarídeo ou até mesmo evidenciar novas propriedades.

O objectivo principal desta dissertação é fazer uma revisão do material publicado na literatura científica relacionado com o ulvano. Antes de proceder à análise de estudos que demonstram as propriedades potenciais do polissacarídeos referido, torna-se necessário referir as fontes biológicas e posteriormente, uma análise das metodologias de extracção do polímero, assim como da sua composição e estrutura molecular e propriedades físico-químicas. O estudo das propriedades funcionais do ulvano será dividido neste trabalho em duas categorias: as propriedades biológicas, nas quais se englobam o potencial nutricional, farmacológico e biomédico; e as propriedades funcionais, que agrupam as aplicações industriais, ambientais e alimentares, entre outras. Posto isto, é de vital importância analisar a influência das modificações químicas, essencialmente da hidrólise, que podem ser feitas ao ulvano, com o objectivo de melhorar as propriedades existentes no polissacarídeo, assim como a descoberta de eventuais novas propriedades (tal como referido anteriormente); tendo em vista maximizar o potencial do ulvano e a sua gama de utilizações

Em paralelo, é feito um levantamento de mercado dos produtos à base de algas no Concelho do Porto para avaliar o potencial de comercialização do ulvano, assim como para determinar a diversidade de produtos existentes á base de macroalgas.

Capítulo II – Obtenção e Caracterização do Ulvano:

➤ 2.1. Obtenção e Extração:

O ulvano é habitualmente extraído através de processos físico-químicos a partir de algas pertencentes à ordem *Ulvales*. As algas pertencentes a *Ulva* sp. estão amplamente distribuídas nas zonas litorais e sublitorais de praticamente todo o mundo, tendo maior impacto em zonas ricas em nutrientes, como por exemplo na costa da Bretanha, devido à excessiva descarga de fertilizantes resultante da agricultura intensiva praticada no local. A *Ulva lactuca* é normalmente considerada a espécie-tipo deste género [Guiry et al., 2012; *AlgaeBase*].

Na grande maioria dos estudos analisados, a alga foi directamente colhida do meio natural, tendo sido utilizadas diferentes espécies de diferentes partes do globo, tal como mencionado na Tabela 2.1. O procedimento generalizado envolveu também a lavagem da alga e posterior secagem, corte e armazenamento até à realização do processo de extração, que apresenta várias variantes, conforme pode ser analisado na Tabela 2.1.

Como se pode observar da análise da Tabela 2.1, as metodologias de extração variam de estudo para estudo, embora exista sempre uma base comum, que consiste na filtração, para eliminar os resíduos resultantes do esmagamento, e na precipitação da solução obtida com etanol, seguida da liofilização para posterior armazenamento. As metodologias também variam muito em função do objectivo experimental para o qual se pretende extrair o ulvano. Para ensaios biomédicos e de caracterização química [Alves et al., 2010; Costa et al., 2012], a pureza torna-se muito mais importante (sendo desejável valores de pureza superiores a 85%) do que para outro tipo de experiências, como por exemplo o ensaio de fixação de metais pesados [Areco et al., 2012], em que a alga é simplesmente lavada, esmagada, moída e o pó armazenado.

Tabela 2.4. Quadro-resumo referente aos diferentes processos de obtenção e extração do Ulvano.

Espécie	Estado da alga	Condições de extração	Rendimento de extração	Grau de pureza	Referências
<i>Ulva lactuca</i>	Seca	Soxhlet, c/diclorometano e etanol; seguido de três extrações com água quente a 75-85 °C, durante 7 h.	N/D	88%	Costa <i>et al.</i> , 2012; Alves <i>et al.</i> , 2010
		Soxhlet, c/etanol 95% (v/v), <i>overnight</i>	N/D	N/D	Sathivel <i>et al.</i> , 2008
		Soxhlet, c/etanol 85% (v/v), durante 3 h a 60 °C.	10,3-11,3%	N/D	El-Baky <i>et al.</i> , 2009
		Soxhlet, c/água quente, a 60°C durante 3 h.	14,5-16,8%	N/D	El-Baky <i>et al.</i> , 2009
		Suspensão em solução de oxalato de sódio, durante 3 h a 60 °C	20%	N/D	El Modafar <i>et al.</i> , 2012; Ray <i>et al.</i> , 1995;
<i>Ulva conglobata</i>		Soxhlet, c/água quente, a 100°C durante 2 h.	N/D	N/D	Mao <i>et al.</i> , 2006
<i>Ulva pertusa</i>		Filtração e diálise c/membrana de porosidade 10,000 Da	22,5%	N/D	Qi <i>et al.</i> , 2005; Qi <i>et al.</i> , 2006; Qi <i>et al.</i> , 2012
		Filtração e diálise	23,2%	N/D	Yu <i>et al.</i> , 2003
<i>Ulva fasciata</i>		Filtração	N/D	N/D	Freitas <i>et al.</i> , 2012
<i>Ulva rigida</i>		Soxhlet, c/água quente a 90-100°C durante 1h.	7%	N/D	Paradossi <i>et al.</i> , 1999
		Filtração e diálise	24,3%	N/D	Toskas <i>et al.</i> , 2011
	S/T	Filtração, diálise e cromatografia	N/D	N/D	Leiro <i>et al.</i> , 2007
<i>Ulva rotundata</i>	Variado	Suspensão em solução de oxalato de sódio, durante 3 h a 60 °C	N/D	N/D	Collén <i>et al.</i> , 2011; Robic <i>et al.</i> , 2008

Legenda: N/D – Não disponível; S/T – Sem tratamento prévio à homogeneização;

Segundo Costa *et al.*, 2012; o processo de extração básico não elimina alguns componentes da parede celular que podem estar ligados ao ulvano, tais como as

glucoronanas, as xiloglucanas, a celulose e as proteínas; o que pode ser um interferente nos ensaios subsequentes. Tal justifica a necessidade da realização de etapas adicionais de purificação com o objectivo de aumentar o grau de pureza do produto final. Com este intuito, um dos processos mais comumente utilizado está ilustrado na Figura 2.1.:

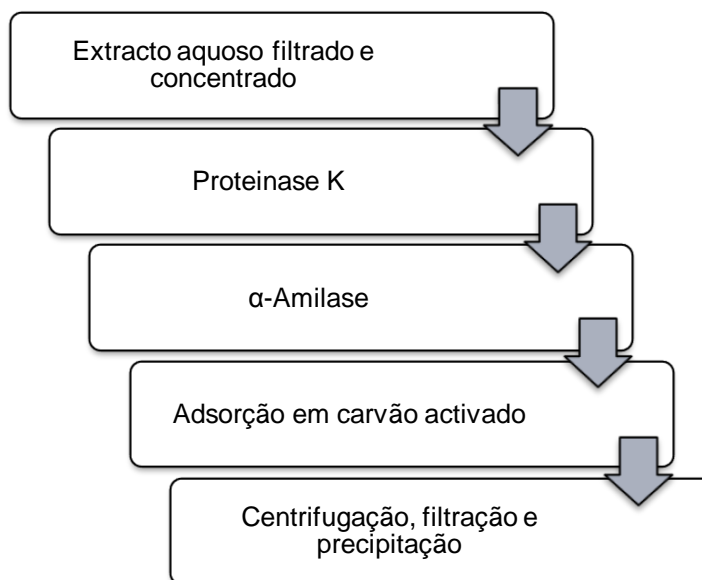


Figura 2.1. Processo de purificação do ulvano de acordo com Costa *et al.*, 2012.

O tratamento com proteína K tem como objectivo eliminar as proteínas presentes no extracato, na sua maioria componentes da parede celular e que podem estar associadas à molécula de ulvano. De seguida, o tratamento com α -amilase visa degradar o amido que ainda possa existir no filtrado, dado este ser um componente de grande importância a nível quantitativo nas células de *Ulva* sp. Para terminar, o tratamento por adsorção em carvão activado actua como um tratamento desodorizante e descolorante [Costa *et al.*, 2012].

De momento, esta metodologia foi a que permitiu a obtenção de um extracto mais puro (88% de pureza), sendo que os 12% restantes são compostos por cinzas (10%) e resíduos de proteínas e glucose (2%), sem interferência com a composição e estrutura química. De acordo com o descrito previamente na literatura, o alto teor em cinzas é bastante comum nos polissacarídeos de origem marinha e é essencialmente resultante da elevada quantidade de sulfatos presentes nestes polímeros – a quantificação dos sulfatos nas cinzas revelou que apenas 10 a 18% das cinzas não são compostos por sulfatos, resultando essencialmente de catiões que se ligam aos sulfatos e aos ácidos carboxílicos, tais como magnésio, sódio e potássio. De acordo com os autores que aplicaram esta metodologia de purificação, o grau de pureza elevado e o tipo de contaminantes encontrados permite que se possa afirmar que, à

partida, todos os hidratos de carbono encontrados na amostra pertencem ao ulvano [Alves *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012].

Geralmente, o polissacarídeo resultante do processo de extracção é liofilizado, e armazenado ao abrigo da luz e da humidade, para ser utilizado posteriormente [Alves *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012]. O armazenamento, tal como o procedimento de purificação, depende muito do objectivo de utilização do polissacarídeo, dado que, além da prevenção da degradação química, é também importante ter atenção á contaminação microbiológica [Robic *et al.*, 2008]. Uma contaminação microbiológica pode acarretar problemas graves, dado que se esta a estudar um composto para aplicações em áreas tão sensíveis como a alimentação e a saúde humana, pelo que é de vital importância realçar esta questão. Na literatura, há muito pouca informação reportada, porque até ao momento os estudos têm incidido em ensaios sobre as propriedades e o mecanismo por trás delas, mas em estudos posteriores, como por exemplo ensaios *in vivo* será necessário prestar atenção redobrada a este ponto.

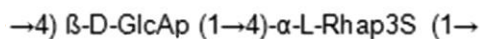
Neste contexto, têm sido feitos alguns estudos que visam aprofundar o conhecimento sobre a estabilidade e processos de tratamento do polissacarídeo, desde a colheita até ao armazenamento, consoante o objectivo do trabalho (Alves *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 1996; Robic *et al.*, 2008). Dada a diversidade de metodologias envolvidas, ainda não existe um processo optimizado, embora se saiba que, para um melhor rendimento de extracção, as amostras de *Ulva* sp. colhidas devem ser secas ao ar a cerca de 70°C. Relativamente ao armazenamento, o processo indicado acima é considerado o mais prático e o mais seguro [Robic *et al.*, 2008].

➤ 2.2. Composição Química e Estrutural:

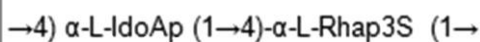
O estudo das algas pertencentes à Ordem dos *Ulvales* não é propriamente um acontecimento recente, principalmente no que concerne á sua estrutura química (Ray *et al.*, 1995; Lahaye *et al.*, 1996), porém apenas em meados da década de noventa se começou a dar maior atenção a estas espécies marinhas e se procurou saber com maior exactidão qual a sua estrutura molecular e características físico-químicas; assim como determinar o potencial funcional, tanto a nível biológico como tecnológico-industrial dos seus componentes, principalmente da enorme quantidade de polissacarídeos encontrados nas paredes celulares das algas pertencentes a *Ulva* sp. [Collén *et al.*, 2011; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Lahaye *et al.*, 1996; Paradossi *et al.*, 1999; Ray *et al.*, 1995; Toskas *et al.*, 2011; Wijesekara *et al.*, 2011].

Estudos posteriores permitiram caracterizar de uma forma mais rigorosa estes compostos, dos quais se destaca claramente o ulvano, designação conferida a todos os polissacarídeos sulfatados hidrossolúveis provenientes da Ordem dos *Ulvales* [Lahaye *et al.*, 1996; Lahaye *et al.*, 2007], e que culminam no estudo de Costa *et al.*, 2012; em que se procedeu á caracterização estrutural e físico-química mais detalhada até ao momento.

A nível estrutural, os estudos até agora realizados permitem afirmar que o ulvano é um heteropolissacarídeo, cuja principal unidade repetitiva é o ácido ulvanobiurónico 3-sulfato, também designada como ácido aldobiurónico (Lahaye *et al.*, 1996; Lahaye, 1998); e é composta por ramnose-O-3-sulfato e ácido glucorónico (tipo A, A3S), apresentando-se da seguinte forma:



Verifica-se também a presença de outra estrutura típica em que o ácido glucorónico é substituído por ácido idurónico (tipo B, B3S) com a seguinte configuração:



em que **p** indica a presença de uma forma piranosídica do composto.

Outra estrutura que ocorre neste polímero é a ligação de xilose, sulfatada ou não no oxigénio ligado ao carbono-2; e ligada à ramnose sulfatada. Estas unidades são designadas por ulvanobioses, representadas de forma espacial na Figura 2.2.:

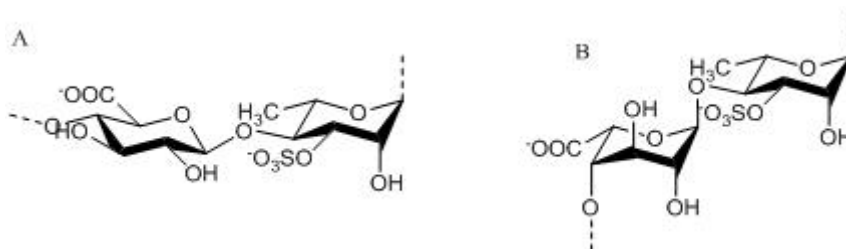
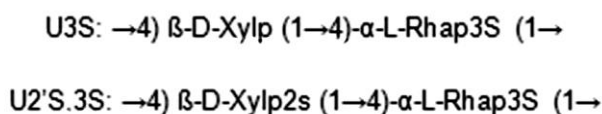


Figura 2.2. Representação estrutural das unidades repetitivas do ulvano [Jiao *et al.*, 2011].

Estão também descritas na literatura outras unidades, envolvendo os mesmos resíduos e por vezes ligadas ao ácido glucorónico, que aparecem com muito menor incidência [Collén *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 1996; Lahaye *et al.*, 1998; Lahaye, 1998; Lahaye *et al.*, 2007; Toskas *et al.*, 2011].

Para fazer uma caracterização físico-química mais detalhada, um passo importante é a despolimerização do ulvano, isto é a decomposição total do polissacarídeo, que é feita habitualmente com recurso a um processo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas, denominado por hidrólise de Saeman [Costa *et al.*, 2012; Kamerling *et al.*, 2007]. Contudo, este

método provou-se pouco eficaz para quebrar ligações glicosídicas envolvendo ácidos urónicos [Costa *et al.*, 2012; Dahlman *et al.*, 2000], pelo que se procedeu também à despolimerização com recurso ao método da metanólise ácida, que se revelou como o método preferencial, permitindo assim a determinação do teor individual dos vários açúcares [Costa *et al.*, 2012; Sundberg *et al.*, 1996]. Outro processo referido na literatura e que pretende resolver as falhas existentes na hidrólise de Saeman é a hidrólise quimio-enzimática, na qual se procede à degradação do polissacarídeo em meio moderadamente ácido, para clivar a maioria das ligações e libertar os ácidos aldobiurónicos, que são em seguida submetidos a uma hidrólise enzimática catalisada pela β -D-gluconidase [Lahaye *et al.*, 2007]. O processo de despolimerização permite assim identificar individualmente os componentes do polissacarídeo [Costa *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 2007].

Nos diversos estudos analisados, foi possível encontrar uma vasta gama de testes, tendo em vista aprofundar o conhecimento sobre a estrutura físico-química do ulvano. O teor e a quantidade destes testes depende do objectivo do estudo, isto é, estudos como Costa *et al.*, 2012 e Lahaye *et al.*, 2007 são estudos que se focam quase inteiramente na vertente químico-estrutural da molécula do ulvano, enquanto muitos outros se concentram nas propriedades biológicas ou tecnológicas do polissacarídeo, daí a diversidade analítica, como pode ser analisada na Tabela 2.2:

Tabela 5.2. Resumo dos principais métodos analíticos utilizados na caracterização do ulvano e suas aplicações.

Objectivo	Método analítico	Referências
Teor total em açúcares	Método do fenol-ácido sulfúrico	El-Baky <i>et al.</i> , 2009; Karnjanapratum <i>et al.</i> , 2011; Leiro <i>et al.</i> , 2007; Mao <i>et al.</i> , 2006; Mao <i>et al.</i> , 2009; Sathivel <i>et al.</i> , 2008; Toskas <i>et al.</i> , 2011; Yu <i>et al.</i> , 2003;
	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	Collén <i>et al.</i> , 2011; Lahaye <i>et al.</i> , 2007; Robic <i>et al.</i> , 2008
	Cromatografia gasosa	Mao <i>et al.</i> , 2006; Robic <i>et al.</i> , 2008
Teor em cinzas	Análise termogravimétrica	Collén <i>et al.</i> , 2011; Costa <i>et al.</i> , 2012; Mao <i>et al.</i> , 2006; Toskas <i>et al.</i> , 2011
Humidade do extracto	Análise Termogravimétrica	Paradossi <i>et al.</i> , 1999

Tabela 6. 2.(Continuação).

Objectivo	Método analítico	Referências
Teor em sulfatos	Hidrólise com ácido trifluoroacético, seguida de Cromatografia de troca iónica	Costa <i>et al.</i> , 2012; Ray <i>et al.</i> , 1995
	Método de Terho e Hartiala	El-Baky <i>et al.</i> , 2009; Mao <i>et al.</i> , 2006; Mao <i>et al.</i> , 2009
	Hidrólise ácida com HCl	Sathivel <i>et al.</i> , 2008; Yu <i>et al.</i> , 2003
	Método da gelatina-BaCl ₂	Karnjanapratum <i>et al.</i> , 2011; Qi <i>et al.</i> , 2005
	Turbidimetria (Tabatabai, 1974)	Collén <i>et al.</i> , 2011; Robic <i>et al.</i> , 2008
Quantificação de resíduos de proteínas no extracto	Método colorimétrico, utilizando o Kit BCATM Protein Assay,	Costa <i>et al.</i> , 2012
	Método de Bradford	Mao <i>et al.</i> , 2009
	Método de Lowry	Karnjanapratum <i>et al.</i> , 2011; Leiro <i>et al.</i> , 2007
	Método de micro-Kjeldahl	Toskas <i>et al.</i> , 2011
	Método de Kjeldahl	Collén <i>et al.</i> , 2011; Robic <i>et al.</i> , 2008
Análise Elementar (carbono, hidrogénio, enxofre, azoto e oxigénio)	Análise orgânica elementar	Costa <i>et al.</i> , 2012
Determinação do peso molecular	Cromatografia de exclusão molecular de alta pressão (HPSEC)	Collén <i>et al.</i> , 2011; Costa <i>et al.</i> , 2012; Robic <i>et al.</i> , 2008
	Cromatografia de exclusão molecular de alta performance/permeabilidade em gel	Karnjanapratum <i>et al.</i> , 2011; Lahaye <i>et al.</i> , 2007; Leiro <i>et al.</i> , 2007; Mao <i>et al.</i> , 2009; Toskas <i>et al.</i> , 2011; Yu <i>et al.</i> , 2003
Quantificação dos monossacarídeos	Cromatografia Gasosa (GC)	Costa <i>et al.</i> , 2012; Leiro <i>et al.</i> , 2007; Mao <i>et al.</i> , 2009;
	Cromatografia Gasosa (GC) – Espectrometria de Massa (MS)	Toskas <i>et al.</i> , 2011
	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	El-Baky <i>et al.</i> , 2009; Karnjanapratum <i>et al.</i> , 2011
Determinação das propriedades térmicas do polissacarídeo	Análise termogravimétrica	Alves <i>et al.</i> , 2010
	Calorimetria Diferencial de Varrimento	Alves <i>et al.</i> , 2010
	Análise Mecânica Dinâmica	Alves <i>et al.</i> , 2010
Viscosidade	Viscosímetro Capilar	Lahaye <i>et al.</i> , 2007; Robic <i>et al.</i> , 2008; Yu <i>et al.</i> , 2003
	Reómetro	Robic <i>et al.</i> , 2008; Toskas <i>et al.</i> , 2011

Tabela 7. 2.(Continuação).

Objectivo	Método analítico	Referências
Caracterização químico-estrutural do polissacarídeo	Espectroscopia Infravermelho (IV)	Alves <i>et al.</i> , 2010; El-Baky <i>et al.</i> , 2009; Mao <i>et al.</i> , 2006; Mao <i>et al.</i> , 2009; Paradossi <i>et al.</i> , 1999; Toskas <i>et al.</i> , 2011; Yu <i>et al.</i> , 2003
	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN)	Alves <i>et al.</i> , 2010; Lahaye <i>et al.</i> , 2007; Leiro <i>et al.</i> , 2007; Mao <i>et al.</i> , 2006; Paradossi <i>et al.</i> , 1999; Robic <i>et al.</i> , 2008; Toskas <i>et al.</i> , 2011
	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^{13}C RMN)	Lahaye <i>et al.</i> , 2007; Robic <i>et al.</i> , 2008
	Espectroscopia de Dicroísmo Circular	Paradossi <i>et al.</i> , 1999
Teor em Ácidos Urónicos	Método colorimétrico com metahidroxidifenil	Karnjanapratum <i>et al.</i> , 2011; Leiro <i>et al.</i> , 2007; Robic <i>et al.</i> , 2008; Sathivel <i>et al.</i> , 2008; Toskas <i>et al.</i> , 2011; Yu <i>et al.</i> , 2003
	Método do carbazole-ácido sulfúrico	Mao <i>et al.</i> , 2006; Mao <i>et al.</i> , 2009
	Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	Collén <i>et al.</i> , 2011; Lahaye <i>et al.</i> , 2007

Dos estudos disponíveis é possível determinar que o ulvano é um polissacarídeo de elevado peso molecular, embora o seu valor exacto seja indeterminado devido à elevada tendência de agregação que o polímero apresenta, o que implica uma variação significativa do valor do peso molecular consoante a técnica utilizada [Costa *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 2007].

No que se refere à composição química, o ulvano apresenta um elevado teor em sulfatos e é rico em ramnose e ácido glucorónico, embora apresente também pequenas quantidades de ácido idurónico e xilose [Collén *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012, El-Baky *et al.*, 2009; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Leiro *et al.*, 2007; Paradossi *et al.*, 1999, Toskas *et al.*, 2011]; também não são de excluir quantidades vestigiais de outros açúcares [Lahaye *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2003]. Verifica-se que existem diferenças consoante o meio natural em que se encontra a alga (local de colheita), época de colheita, stress biótico e outros factores naturais, o que induz obrigatoriamente algum grau de variabilidade entre lotes, embora esta não seja acentuada e ainda não se tenha encontrado um padrão que relacione as composições com as

diferentes condições [Alves *et al.*, 2010; Collén *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012, El-Baky *et al.*, 2009; Lahaye *et al.*, 2007]. Neste campo, foi também reportada a grande importância das metodologias de extracção e purificação, pois diferenças nestas técnicas originaram alterações na caracterização físico-química e, conseqüentemente, das propriedades do polissacarídeo [Collén *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012, El-Baky *et al.*, 2009; Lahaye *et al.*, 2007; Paradossi *et al.*, 1999]. A variabilidade do ulvano entre as diferentes espécies de *Ulva* sp. foi também confirmada, devido à alteração do rácio dos diferentes componentes consoante a espécie de onde o extracto provinha [El-Baky *et al.*, 2009; Lahaye *et al.*, 2007]. Não se pode excluir a presença de contaminantes resultantes, por exemplo, da co-extracção de outros polissacarídeos da parede celular com variabilidade sazonal, como um dos factores que induz a heterogeneidade molecular e variabilidade do ulvano [Lahaye *et al.*, 2007].

A caracterização física do ulvano adquire grande importância porque em alguns processos é necessário submeter a amostra a calor intenso, pelo que é necessário ter conhecimento da sua estabilidade térmica. Os ensaios realizados até ao momento mostram que o ulvano é estável até temperaturas entre os 200 e 220 °C, e que possui uma estrutura semi-cristalina, em que a componente cristalina representa cerca de 15% da estrutura total. Tal como referido acima, o ulvano é solúvel em água, tendo propriedades higroscópicas o que, dada a sua estrutura maioritariamente amorfa, origina variação da quantidade de água adsorvida na molécula consoante a humidade atmosférica [Alves *et al.*, 2010]. O ulvano apresenta também uma baixa viscosidade intrínseca, capacidade de ligação a metais pesados, glucoronanas e proteínas e elevada capacidade de formação de géis (embora este mecanismo ainda não seja devidamente conhecido) [Lahaye *et al.*, 2007]. Todas estas propriedades resultam de conformações moleculares específicas da estrutura primária da molécula do ulvano [Lahaye *et al.*, 2007].

Capítulo III – Propriedades Funcionais do Ulvano:

➤ 3.1. Propriedades Biológicas:

• 3.1.1. Actividade Antioxidante:

A pesquisa de compostos com propriedades antioxidantes provenientes de fontes naturais tem registado grandes avanços nos últimos anos, sem dúvida resultante da cada vez maior importância que se atribui a estes compostos no combate ao stress oxidativo e suas consequências nefastas para o organismo [Costa *et al.*, 2010; El-Baky *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010].

O stress oxidativo resulta da formação de espécies reactivas de oxigénio ou radicais livres de oxigénio no organismo. Estas moléculas ocorrem naturalmente, maioritariamente resultantes do processo metabólico a nível celular; mas com o passar dos anos a influência de factores externos, tais como poluentes ambientais, exposição a radiação e a dieta, têm adquirido cada vez maior importância; e incluem as seguintes partículas: radical aniónico ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), singleto de oxigénio (1O_2) e óxido nítrico (NO^*) [El-Baky *et al.*, 2009; Gião *et al.*, 2007; Lehninger *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010].

Os radicais livres interagem com o DNA nas células, oxidando-o; o que induz erros que levam, com o decurso do tempo, à morte celular; mas também com os lípidos e proteínas. Este processo é denominado por stress oxidativo e sabe-se que está associado a uma vasta gama de problemas de saúde, tais como processos de carcinogénese, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças inflamatórias, doenças neurodegenerativas (ex: Alzheimer) e cirrose hepática, assim como ao processo de envelhecimento *per si*. Torna-se portanto vital combater o stress oxidativo com recurso a compostos antioxidantes [Costa *et al.*, 2010; El-Baky *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010, Wijesekara *et al.*, 2011].

Os primeiros compostos antioxidantes foram desenvolvidos como aditivos alimentares, para aumentar o tempo de prateleira dos produtos, sem que as suas propriedades edíveis se alterassem ou que o alimento entrasse em processo de decomposição. Compostos com estas propriedades, como o propil galato (PG), butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e butilhidroxiquinona terciária (TBHQ), surgem actualmente como conservantes alimentares para prevenir a peroxidação dos lípidos, mas a sua utilização não tem sido isenta de controvérsia, pois alguns estudos mais recentes levantam a hipótese de estes compostos sintéticos não serem totalmente isentos de toxicidade, causando problemas hepáticos e indução de carcinogénese. Por isso, a pesquisa de compostos antioxidantes direccionou-se para produtos naturais, tais como plantas e as algas marinhas, nas quais os polissacarídeos revelaram enorme potencial *in vitro* e *in vivo*. Aliado ao potencial farmacológico e nutricional que representam, estes polímeros estão na linha da frente da investigação [El-Baky *et al.*, 2009; Ngo *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006; Sathivel *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010, Wijesekara *et al.*, 2011].

A pesquisa de actividade antioxidante em compostos biológicos tem sido amplamente desenvolvida na literatura desde os métodos de *screening* inicial até aos métodos mecanísticos mais complexos. A Tabela 3.1. lista a gama bastante variada de técnicas que têm sido aplicadas ao ulvano, cada qual com as suas particularidades e que permite avaliar, à sua maneira, um tipo de reacção química com efeito antioxidante [Huang *et al.*, 2005; Karadag *et al.*, 2009; Prior *et al.*, 2005; Wijesekara *et al.*, 2011].

Nos vários ensaios feitos com o ulvano ou outros polissacarídeos sulfatados, evidenciou-se a presença de actividade antioxidante. Determinante para a intensidade desta é o teor em sulfatos do polissacarídeo, o que mais uma vez permite corroborar o potencial esperado deste grupo particular de polímeros [El-Baky *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010].

Tabela 8.1. Metodologias de estudo de actividade antioxidante do ulvano (adaptada de Prior *et al.*, 2005).

Metodologia	Simplicidade	Mecanismo de acção	Condições de extracção	Actividade antioxidante	Referências
DPPH	++	Transferência de electrões	Água quente	87.63-93.09%	El-Baky <i>et al.</i> , 2009;
			Etanólica	61.74-64.36%	
ABTS	+		Água quente	13.54-15.25 µmol trolox/g	El-Baky <i>et al.</i> , 2009;
			Etanólica	17.66-19.55 µmol trolox/g	
Detecção do radical superóxido	+	Transferência de prótons	Filtração e Diálise	75,1%	Qi <i>et al.</i> , 2005; Qi <i>et al.</i> , 2006;
Detecção do radical hidroxilo	+		Filtração e Diálise	40%	Qi <i>et al.</i> , 2005; Qi <i>et al.</i> , 2006;
Determinação do poder redutor	+		Filtração e Diálise	0.20 g/ml eq. ácido ascórbico	Qi <i>et al.</i> , 2005; Qi <i>et al.</i> , 2006;

Legenda: + - Fácil; ++ - Intermédio; +++ - Difícil.

Tendo como objectivo não só avaliar a importância do teor em sulfatos na actividade antioxidante, mas também a possível potenciação desta através de outras modificações químicas, Qi *et al.*, procederam a um conjunto de ensaios com ulvanos modificados, tal como descrito à frente em 4.1.2. e 4.2.1. [Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006; Wijesekara *et al.*, 2011].

El-Baky *et al.* (2009) que trabalharam directamente com amostras de ulvano, obtiveram elevada actividade antioxidante em todas as concentrações testadas, de uma forma directamente proporcional á concentração. Os resultados obtidos foram semelhantes a outros ensaios prévios descritos na literatura, e próximos de outros antioxidantes naturais, embora

tenham sido evidenciadas diferenças entre os métodos de extracção, destacando-se a extracção em água quente.

Ensaio de pesquisa de actividade antioxidante efectuados com outros polissacarídeos sulfatados, como as fucoidanas (Wang *et al.*, 2010), filofeofitinas e fucoxantinas corroboram a hipótese de que existem vários factores estruturais que influenciam esta capacidade, tendo-se verificado valores de actividade antioxidante para espécies de menor peso molecular e com maior teor em sulfatos. Este último parâmetro, em particular, tem sido apontado como o principal responsável pela elevada capacidade antioxidante, tornando-se assim num alco preferencial para a modificação química por forma a potenciar esta actividade, tal como descrito em 4.1.2. e 4.2.1. Embora ainda sejam necessários mais estudos, o potencial do ulvano como composto antioxidante está claramente demonstrado [El-Baky *et al.*, 2009; Wijesekara *et al.*, 2011].

▪ 3.1.2. Actividade Antiproliferativa/Anticarcinogénica:

Os polissacarídeos sulfatados têm vindo a ser estudados com cada vez maior intensidade na busca de novos medicamentos com propriedades antiproliferativas/anticarcinogénicas, tendo em vista complementar ou mesmo, num prazo mais alargado, substituir a quimioterapia. Na literatura científica, há sinais positivos da actividade antiproliferativa de polissacarídeos sulfatados derivados de algas marinhas em linhas celulares *in vitro*, assim como em ensaios *in vivo* em ratos com tumores [Costa *et al.*, 2010, Karnjanapratum *et al.*, 2011; Wijesekara *et al.*, 2011].

Outros estudos já descritos demonstraram que estes compostos induzem apoptose em várias linhas celulares tumorais e são capazes de estimular células do sistema imunitário que estão envolvidas no combate a tumores (Costa *et al.*, 2010; Wijesekara *et al.*, 2011). Existe ainda actividade antimetastásica, dado que os polissacarídeos são capazes de interferir com a interacção entre as células cancerosas e a membrana basal dos órgãos; existe igualmente potencial de inibição da angiogénese também por um mecanismo de interferência na ligação entre o factor de crescimento endotelial vascular e o factor de crescimento básico dos fibroblastos (Costa *et al.*, 2010; Wijesekara *et al.*, 2011). A existência de actividade antioxidante contribui também para uma acção anticarcinogénica, dado que os radicais livres são uma das causas de cancro, tal como referido em 3.1.1. [Costa *et al.*, 2010, Wijesekara *et al.*, 2011].

El-Baky *et al.* (2009) procederam a ensaios de determinação da actividade antitumoral, testando as amostras contra duas linhas celulares tumorais: células MCF-7, de adenocarcinoma mamário; e células HepG2, de carcinoma hepatocelular; sendo que a capacidade antiproliferativa foi medida através da determinação da viabilidade celular por métodos colorimétricos e pelo cálculo de IC₅₀; ou seja, concentração de amostra de ulvano necessária para inibir o crescimento de 50% das células. Os resultados obtidos foram bastante

promissores, pois foi observada forte actividade antiproliferativa, principalmente contra as células da linha MCF-7, directamente proporcional á concentração. Contudo, foram observadas algumas diferenças interessantes, relativamente á influência do método de extracção e também das condições de cultivo da alga. Por exemplo, enquanto as células HepG2 foram susceptíveis de uma maneira relativamente uniforme a todas as amostras, no caso das células MCF-7, os melhores resultados foram obtidos com as amostras de ulvano extraídas em água quente, ao invés da extracção etanólica; o que pode estar relacionado com as diferentes interacções químicas que podem ocorrer nos diferentes processos por parte dos grupos sulfato e também dos ácidos urónicos, tidos como pontos-chave nas propriedades dos polissacarídeos sulfatados, como as fucoidanas, carragenanas e ulvanos [El-Baky *et al.*, 2009; Wijesekara *et al.*, 2011].

Karnjanapratum *et al.*, (2011) efectuaram também ensaios para avaliar a actividade antiproliferativa, embora utilizando polissacarídeos provenientes de *Monostroma nitidum*. Contudo, sendo esta uma alga verde pertencente à Divisão Chlorophyta, e sendo composta por um polissacarídeo sulfatado com muitas semelhanças estruturais com o ulvano; este estudo adquire uma maior importância. As linhas celulares utilizadas foram células AGS, de carcinoma gástrico humano, e HeLa, de cancro cervical humano; e os resultados foram avaliados por métodos colorimétricos. A percentagem de inibição registada para o polissacarídeo extraído de *M.nitidum* foi bastante relevante, principalmente no caso das células AGS, tendo inclusive demonstrado maior actividade do que em ensaios com outros polissacarídeos sulfatados extraídos de algas verdes, como os provenientes de *Enteromorpha prolifera* e da própria *Ulva lactuca*.

Os estudos efectuados demonstram o potencial promissor destes polissacarídeos, pelo que mais estudos terão que ser efectuados em linhas celulares, para compreender melhor a capacidade antiproliferativa, o mecanismo pelo qual os compostos a exercem, assim como a influência do composto e concentrações utilizadas em células normais, para avaliar a selectividade do polissacarídeo para as células neoplásicas [Costa *et al.*, 2010, El-Baky *et al.*, 2009; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Wijesekara *et al.*, 2011].

▪ 3.1.3. Actividade Antiviral:

Até ao momento, não foram realizados muitos estudos sobre propriedades antivirais de polissacarídeos de algas verdes, embora estejam já descritos na literatura ensaios feitos com outros polissacarídeos com elevado teor em sulfatos, como carragenanas e fucoidanas, que evidenciam actividade antiviral promissora tanto contra os vírus de DNA (ex: *Herpesviridae*), como contra os vírus de RNA (ex: *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Retroviridae*). Contudo, este tipo de polissacarídeos não manifestou até agora eficácia contra vírus sem envelope lipídicos, tais como os pertencentes às famílias *Picornaviridae*, *Reoviridae* e *Adenoviridae*, assim como

alguns Myxovírus de envelope [El-Baky *et al.*, 2009, Karnjanapratum *et al.*, 2011; Kazlowski *et al.*, 2012, Wijesekara *et al.*, 2011].

El-Baky *et al.* (2009) procederam a um ensaio em que testaram amostras de ulvano contra o vírus *Herpes simplex* tipo-1 (HSV-1), usado como modelo de vírus de DNA, para avaliar as propriedades estimadas dos polissacarídeos sulfatados como compostos antivirais. Foram utilizadas células Vero (provenientes de macaco verde Africano), cultivadas em meio HMEM, suplementado com 1% de mistura de antibiótico e antimicótico, e 8% de soro fetal bovino, com o pH ajustado a 7.2 ± 0.2 ; providenciando-se condições favoráveis para crescimento em monocamada. De seguida, as células foram dissociadas com tripsina e versina e cultivadas em placas de 96 poços para efectuar o ensaio de actividade antiviral, cujo resultado foi determinado através da obtenção do IC_{50} , neste caso, a concentração de amostra necessária para reduzir o número de placas virais formadas em 50%.

Os estudos demonstraram actividade antiviral moderada em todas as amostras e, tal como noutras situações, de forma directamente proporcional à concentração. Os valores obtidos foram mais elevados nos extractos obtidos em água quente, mais uma vez este resultado leva a crer que há influência do processo de extracção nas interacções dos grupos sulfato e ácidos urónicos [El-Baky *et al.*, 2009].

Outros estudos feitos com vírus da mesma família, mas com outros polissacarídeos, evidenciaram os resultados positivos relativamente à actividade antiviral, e também ficou provada uma correlação com o grau de sulfatação, dado que polissacarídeos com um teor em sulfatos reduzidos eram inactivos, ao contrário dos compostos com elevado teor em sulfatos. Estudos feitos com o vírus do VIH, um retrovírus [Madigan *et al.*, 2006], apresentaram resultados semelhantes, o que levantou a hipótese de os grupos sulfato estarem envolvidos em vários mecanismos de inibição viral, entre os quais a inibição da enzima transcriptase reversa [Wijesekara *et al.*, 2011].

Por sua vez, Kazlowski *et al.* (2012) fizeram um estudo sobre propriedades antivirais com uma alga pertencente à ordem dos *Ulvales*, mas da família das *Monostromataceae*, a *Monostroma nitidum*, e também a alga vermelha *Gracilaria* sp. Este estudo foi dirigido contra vírus da família *Flaviviridae*, uma família muito alargada que contem algumas espécies patogénicas de relevo para o homem, tais como o vírus da febre amarela, da dengue, “West Nile Fever” e da encefalite japonesa (JEV). Este último foi usado como alvo deste estudo. A encefalite japonesa é prevalente no Extremo Oriente e Sudoeste Asiático, é transmitida a partir de hospedeiros intermediários como porcos, pássaros e mosquitos, tendo o homem como hospedeiro final. A infecção causa exaureca febril, meningite e encefalite, podendo originar danos no sistema nervoso central e risco de vida. Ao contrário da espécie usada no estudo de El-Baky *et al.* (2009) este vírus é um vírus composto por uma cadeia única de RNA positiva, com uma cápside proteica e uma membrana lipídica. Neste vírus, encontram-se dois tipos principais de proteínas – as glicoproteínas do envelope (E) e as pequenas proteínas da

membrana (M). As glicoproteínas E são responsáveis pela ligação da partícula viral ao receptor celular, assim como da fusão com a membrana das células-alvo, através da ligação com o sulfato de heparano existente nas membranas destas. A heparina, um glucosaminoglicano sulfatado (descrita em **3.1.4.**) é um análogo do sulfato de heparano, e actua como inibidor competitivo deste, podendo inibir a replicação viral, e é conhecida como agente de ligação a vários Flavivírus, daí existir evidência de um papel de relevo dos grupos sulfato neste mecanismo, Para avaliar a actividade antiviral, os estudos têm empregado não só o polissacarídeo na forma nativa, mas também o respectivo hidrolisado, sabendo-se que, regra geral, os oligossacarídeos de menor peso molecular podem potenciar as actividades biológicas (ver **4.1.1.** e **4.2.3.**) [Kazlowski *et al.*, 2012, Madigan *et al.*, 2006, Wijesekara *et al.*, 2011].

▪ **3.1.4. Actividade Anticoagulante:**

Os medicamentos anticoagulantes são amplamente utilizados na medicina para uma gama bastante vasta de utilizações, tais como cirurgias, diálise, tratamento da coagulação intravascular disseminada, tromboembolismos (combate e prevenção), doenças coronárias, entre outros; e também no campo das análises clínicas, para preservar a fluidez do sangue em testes *in vitro* sendo que, de momento a heparina, um glucosaminoglicano com um elevado grau de sulfatação, é o fármaco anticoagulante mais utilizado a nível mundial. Contudo, este composto pode induzir efeitos secundários, nos quais se destacam hemorragias e trombocitopenia, além de ser ineficaz em pacientes com deficiências na antitrombina. Assim, a investigação farmacêutica tem procurado cada vez mais compostos que possam substituir a heparina, preferencialmente mais rentáveis e com menos efeitos secundários, adquirindo naturalmente uma particular relevância os polissacarídeos sulfatados devido a similaridades com esta [Costa *et al.*, 2010; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010, Wijesekara *et al.*, 2011].

A pesquisa de novos compostos com propriedades anticoagulantes tem-se desenvolvido bastante nos últimos anos e tem adquirido particular ênfase o estudo das algas marinhas, devido á elevada quantidade de polissacarídeos sulfatados que estas possuem [Costa *et al.*, 2010; El-Baky *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010, Wijesekara *et al.*, 2011]. Contudo, embora existam já bastantes estudos elaborados com macroalgas, os estudos realizados em algas verdes são ainda muito poucos, embora estejam já reportados resultados bastante promissores em *Monostroma* sp. e *Ulva conglobata* [Karnjanapratum *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2009].

O mecanismo de coagulação sanguínea é extremamente complexo, envolvendo 12 factores de coagulação combinados sequencialmente e organizados em três vias: comum, intrínseca e extrínseca, fortemente reguladas por vários compostos [Pallister *et al.*, 2010; Wijesekara *et al.*, 2011], como se pode ver pela análise da Figura 3.1.

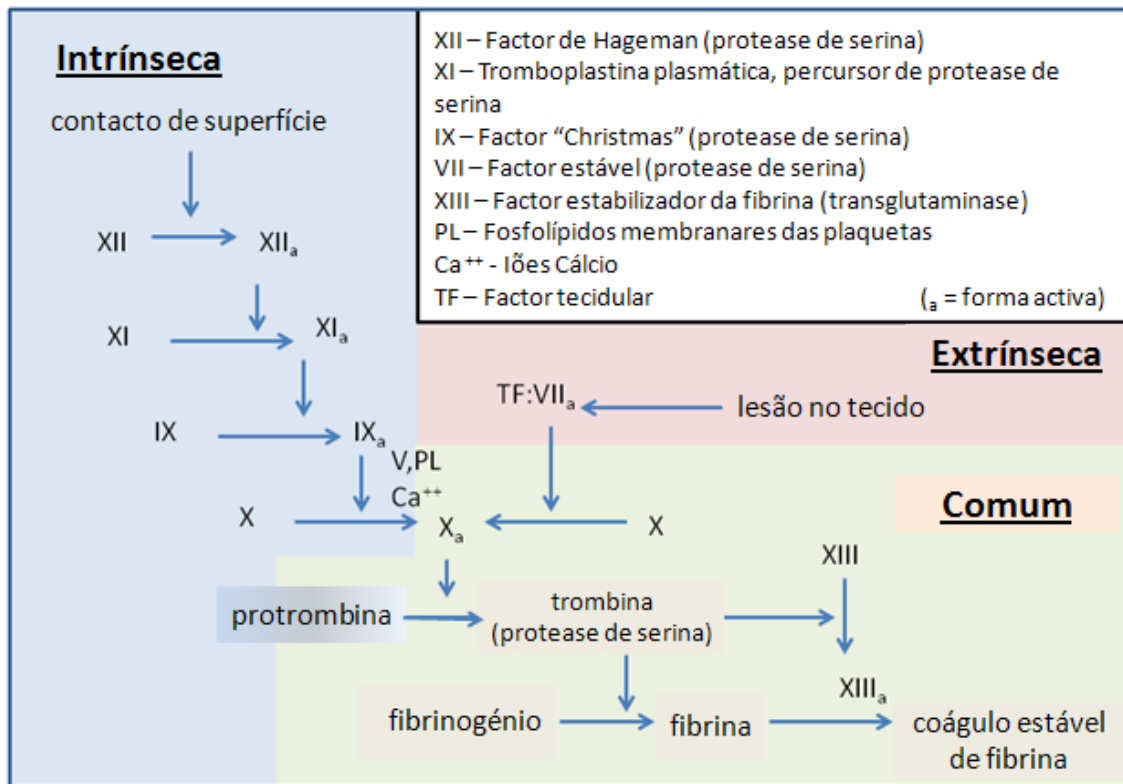


Figura 3.1. Vias de coagulação [Adaptada de Pallister e Watson, 2010].

Para determinar a actividade anticoagulante de novos extractos ou compostos, foram determinados os seguintes parâmetros, de acordo com Mao *et al.* (2009) e Wang *et al.* (2010); sendo que a heparina foi sempre utilizada como padrão [Collicet *et al.*, 1991; Mourão *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2002]; de notar que estes são também os parâmetros utilizados na bioquímica clínica para a avaliação da actividade fisiológica Tempo parcial de activação da tromboplastina (APTT);

1. Tempo de protrombina;
2. Tempo de trombina;
3. Inibição da trombina ou do factor de coagulação Xa por antitrombina III e cofactor II da heparina, na presença do polissacarídeo;

Os resultados obtidos nos vários estudos feitos com polissacarídeos sulfatados foram considerados como bastante promissores, pois foi demonstrada actividade anticoagulante através do prolongamento do tempo de activação da protrombina e do tempo de trombina, mas não do tempo de protrombina (Mao *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que o polissacarídeo sulfatado é capaz de inibir a via intrínseca – traduzida pelo aumento do tempo de activação da protrombina – e a via comum, através da inibição da actividade da trombina – o que impede a conversão de fibronogénio em fibrina - ou da polimerização da fibrina. O não

prolongamento do tempo de protrombina indica inacção sobre a via extrínseca. Contudo, quando comparada com a heparina a actividade anticoagulante da amostra de fucoídano foi inferior (Mao *et al.*, 2009). Relativamente ao parâmetro 4, foi demonstrado que o referido polissacarídeo proveniente da alga *Laminaria japonica* não tem capacidade de inibição directa sobre a trombina ou sobre o factor de coagulação Xa; mas evidencia forte actividade inibitória da trombina quando mediada pelo cofactor II da heparina (inibidor selectivo da trombina); assim como potenciação da antitrombina III (inibidor de todas as enzimas da via intrínseca), embora em muito menor escala (Mao *et al.*, 2009). Costa *et al.* (2010) propuseram por sua vez um mecanismo de inibição do factor Xa e IIa, mediada pela antitrombina; e a inibição do cofactor II da heparina.

Por sua vez, El-Baky *et al.* (2009), estudaram também a actividade anticoagulante no ulvano, embora de uma forma menos detalhada, tendo obtido resultados positivos e directamente proporcionais à concentração, com o potencial máximo na amostra cultivada em condições selvagens e obtida através do extracto etanólico, embora também tenham observado uma actividade anticoagulante inferior à heparina. Contudo, mediante estes resultados baseados apenas no tempo de coagulação, é necessário proceder a estudos mais detalhados, tais como outros referidos no presente capítulo.

No que concerne o mecanismo possível de actuação, tanto os ensaios feitos em *Ulva* sp. como aqueles associados à *Monostroma* sp., duas das espécies mais relevantes de algas verdes e conhecidas pelos seus polissacarídeos sulfatados, não permitiram determinar com exactidão qual o mecanismo que está por detrás da actividade anticoagulante evidenciada, embora seja proposta a formação de um complexo entre os grupos sulfato do polissacarídeo com o inibidor plasmático e a protease-alvo, por forma a bloquear a enzima [Mao *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2009, Pereira *et al.*, 2002; Wijesekara *et al.*, 2011]. No estudo de Wang *et al.* (2010), efectuado com oligofucoídanos (derivados do fucoídano, um polissacarídeo altamente sulfatado extraído de algas castanhas), foi também reportada a importância do teor em sulfatos na capacidade anticoagulante, assim como o facto de os oligossacarídeos terem poder de influenciar a cascata de coagulação tanto na via intrínseca como na via extrínseca.

▪ 3.1.5. Actividade Antihiperlipidémica/Antihipercolesterolémica:

Na actualidade, são cada vez mais reportados casos de alterações no perfil lipídico de indivíduos, nomeadamente a nível do colesterol e triglicéridos. Estas condições são uma das principais causas de arteriosclerose e, conseqüentemente, acidentes cardiovasculares e doenças coronárias, entre outros, o que as torna num dos alvos preferenciais da investigação farmacêutica [Qi *et al.*, 2012].

Os principais factores de risco para a hiperlipidemia são os valores altos de triglicéridos e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, denominado de forma comum como

“mau colesterol”), e uma baixa das lipoproteínas de elevada densidade (HDL, ou “bom colesterol”). As concentrações sanguíneas destes compostos relacionam-se pela fórmula de Friedewald [Qi *et al.*, 2012; Sathivel *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2003] conforme indicado de seguida:

$$\text{LDL} = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + 1/5 \text{ triglicerídeos}).$$

As LDL são lipoproteínas que actuam como transportadores de colesterol do fígado para os restantes tecidos do corpo, enquanto as HDL transportam o colesterol no percurso inverso, para que o colesterol seja usado no catabolismo, conferindo a estas lipoproteínas um papel-chave no transporte reverso do colesterol (RCT) [Yu *et al.*, 2003].

O tratamento da hiperlipidemia (nomeadamente da hiperlipidemia tipo IIa, ou hipercolesterolemia familiar) é efectuado normalmente com recurso a um controlo rigoroso na dieta e a medicação, sendo que o fármaco mais usado devido ao seu potencial para alterar os perfis lipídicos é o niacinato de inositol, normalmente combinado com o clofibrato, mas este e outros reguladores lipídicos tem efeitos indesejáveis, pelo que é necessário descobrir novos compostos, preferencialmente naturais, mais rentáveis e com menos efeitos secundários [Yu *et al.*, 2003].

Estudos recentes demonstraram que as fibras com propriedades de troca iónica têm fortes efeitos na diminuição do colesterol, pois os grupos iónicos são capazes de interagir e sequestrar os ácidos biliares, que são posteriormente excretados nas fezes, em vez de serem reabsorvidos no intestino através do mecanismo de circulação enterohepática [Qi *et al.*, 2012]. Assim, o fígado é forçado a mobilizar colesterol dos tecidos para sintetizar mais ácidos biliares, dado que aquele é o precursor dos mesmos, o que diminui os valores do colesterol no sangue e tecidos. Os polissacarídeos sulfatados, ao serem ricos nos grupos aniónicos sulfato, tornam-se imediatamente alvos preferenciais para estudo destas propriedades, destacando-se o ulvano devido não só ao elevado teor em sulfatos mas também noutra grupo carregado, os ácidos urónicos, estimando-se que estes dois grupos tenham capacidade de sequestrar os sais biliares no lúmen intestinal. O que favorece mais uma eventual utilização do ulvano para fins antihipercolesterolémicos é o facto de este resistir à fermentação pela flora normal do intestino devido à formação de géis derivados da ligação a iões cálcio [Qi *et al.*, 2012; Wijesekara *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2003].

Também muito referido na literatura científica é a importância do peso molecular das fibras nas suas propriedades, devido à alteração em função do peso do processamento das fibras, isto é, do tempo de passagem pelo intestino, do grau de fermentação e da quantidade excretada nas fezes, contudo ainda não se conhece o impacto da hidrólise nas propriedades antihiperlipidémicas, pelo que foram também efectuados ensaios com oligoulvanos (ver **4.1.1.** e **4.2.4.**) [Qi *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2003].

Qi *et al.* (2012), baseando-se em estudos anteriores em que amostras de ulvano foram modificadas para ter maior teor em sulfatos demonstraram maior actividade antioxidante, e propuseram a aplicação desta alteração química tendo em vista a potenciação da actividade antihiperlipidémica, o que pode ser visto em **4.1.2**.

Yu *et al.* (2003), fizeram as experiências alimentares em ratos tendo em vista a determinação de dois parâmetros principais: o perfil lipídico no soro dos animais e o conteúdo fecal em sais biliares; e os resultados obtidos revelaram-se extremamente promissores. Para tal, utilizaram não só o ulvano na sua forma nativa como também procederam à sua hidrólise de acordo com o descrito em **4.1.1.1**.

Após a dissecação dos ratos, verificou-se que todas as amostras, tanto de ulvano como dos respectivos hidrolisados, induziam um aumento no tamanho do cólon, levantando-se a hipótese de que o consumo dos ulvanos diminui a capacidade digestiva e de absorção dos nutrientes, o que faz com que o cólon se expanda para maximizar a área de absorção. Embora não tenha sido feita uma análise aos esteróis neutros nas fezes (que seria um resultado a ter em conta), observou-se uma redução significativa dos valores de colesterol total (45.2%) e de LDL (54.1%) no soro, relativamente aos controlos; o que pode indicar que o mecanismo de sequestro de sais biliares efectivamente ocorre. Além disso, o ulvano tornou-se num componente maioritário no lúmen intestinal, pois ocorreu a formação de um gel com iões Ca^{2+} , o que também dificulta a reabsorção dos sais biliares no íleo, levando à sua excreção nas fezes. Contudo, a excreção não evidenciou diferenças significativas, nem para o ulvano, nem para os seus hidrolisados, tal como descrito em **4.2.4**; o que permite afirmar que são necessários estudos, nomeadamente a nível das enzimas HGM-CoA redutase e 7- α -hidroxilase, para avaliar o efeito do ulvano na diminuição do colesterol sérico [Yu *et al.*, 2003].

▪ **3.1.6. Actividade Antihipertensora:**

A hipertensão arterial é considerada como um dos maiores factores de risco independentes para doenças cardiovasculares, tais como arteriosclerose, acidentes vasculares cerebrais (AVC) e enfarte do miocárdio, assim como para doenças a nível de outros sistemas de órgãos, tais como a doença renal terminal, estimando-se que afecta cerca de 20% da população mundial [Park *et al.*, 2003; Wijesekara *et al.*, 2010].

A indústria farmacêutica tem desenvolvido até ao momento uma vasta gama de fármacos de origem sintética que são utilizados actualmente como tratamento preferencial para o combate a esta doença, tais como o Captopril e o Enalapril. Contudo, estes medicamentos não são desprovidos de efeitos secundários, nos quais se incluem tosse, alterações de paladar, edema angioneurótico e “rash” cutâneo, pelo que se procuram continuamente compostos com menos efeitos colaterais para o utilizador, economicamente mais rentáveis e, se possível de origem natural [Park *et al.*, 2003; Wijesekara *et al.*, 2010].

Um dos pontos-chave nesta pesquisa é a regulação da Enzima conversora da angiotensina (ECA, EC. 3.4.15.1), devido ao seu papel vital na manutenção da pressão arterial. Este mecanismo é um dos utilizados como alvo por parte dos compostos sintéticos de uso corrente, incluindo os exemplos referidos acima, mas foram já identificados vários péptidos provenientes de fontes naturais que evidenciam um potencial promissor para regulação desta enzima e, nos últimos anos, tem sido dada cada vez maior atenção aos florotaninos e aos polissacarídeos [Park *et al.*, 2003; Wijesekara *et al.*, 2010].

A ECA é uma exopeptidase secretada pelas células endoteliais dos pulmões e dos rins e que actua no organismo de acordo com a Figura 3.2. [Wijesekara *et al.*, 2010]:

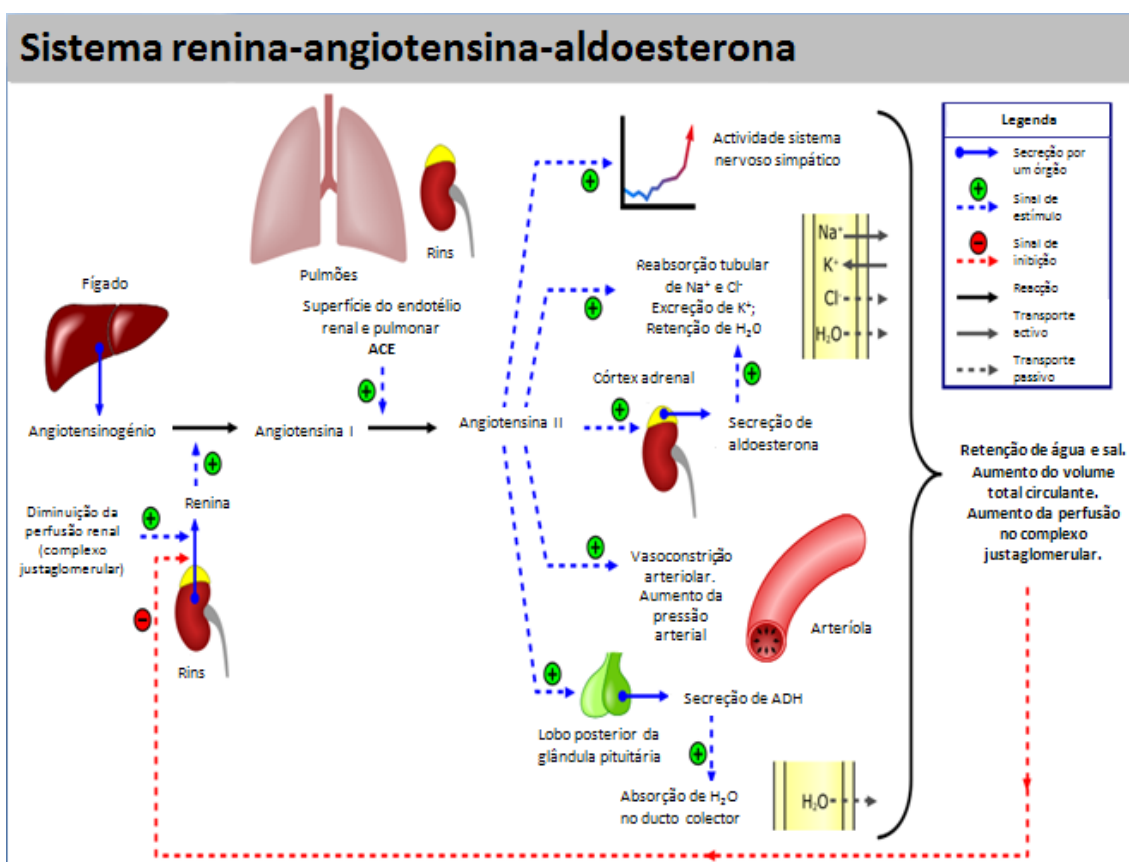


Figura 3.2. Ilustração do Sistema renina-angiotensina-aldosterona [Adaptada de Boron e Boulpaep, 2005].

Para avaliar o potencial de inibição da ECA por parte dos polissacarídeos provenientes de algas ou de hidrolisados destes (ver 4.1.1.), Park *et al.* (2003) basearam-se no Método de Cushman e Cheung [Wu *et al.*, 2002], descrito na Figura 3.3. Neste estudo, utilizaram quitosanas – um polissacarídeo resultante da deacetilação alcalina parcial da quitina, um componente maioritário de paredes celulares dos fungos e do exoesqueleto de crustáceos e insectos - que já haviam provado ausência de toxicidade em testes *in vivo*, e são conhecidos por uma gama abrangente de propriedades biológicas [Wijesekara *et al.*, 2010].

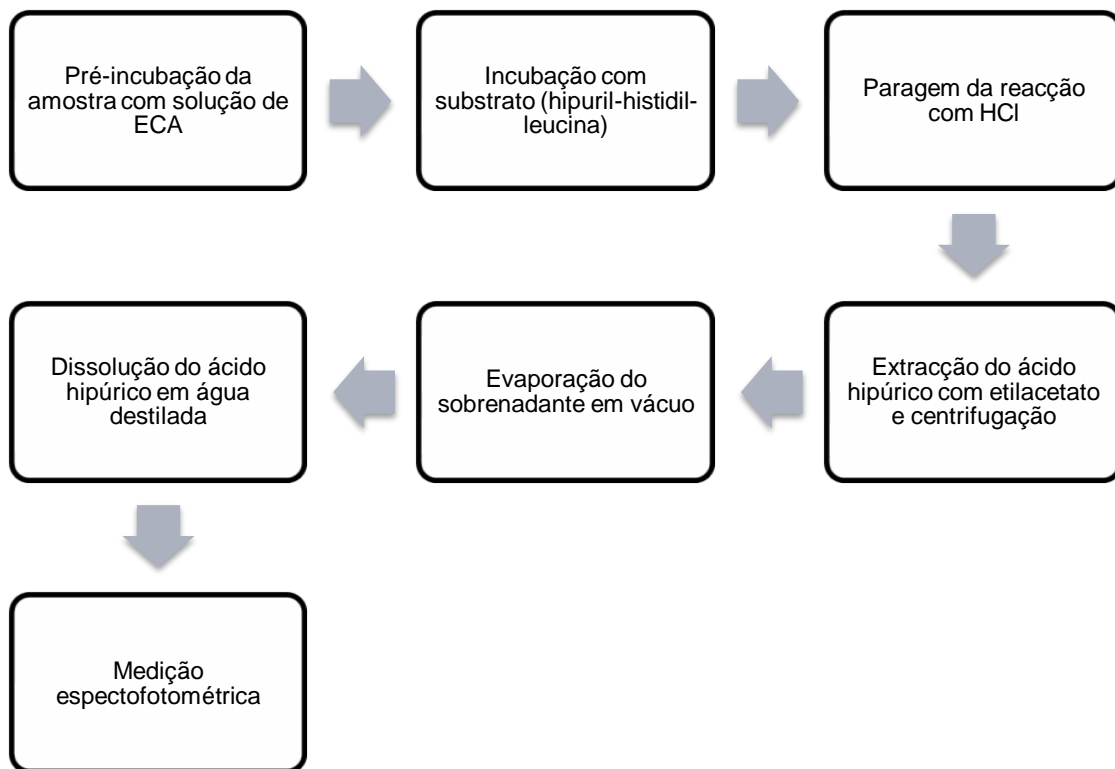


Figura 3.3. Procedimento de determinação de actividade de inibição da ECA de acordo com o Método de Cushman e Cheung [Wu et al., 2002].

Para determinar o padrão de inibição da ECA, Park *et al.* (2003) adicionaram diferentes concentrações de quitooligossacarídeos da amostra à mistura de reacção e determinaram também, com recurso a variações nas concentrações de substrato, a cinética da ECA na presença do inibidor, através do gráfico de Lineweaver-Burk.

Por sua vez, Wijesekara *et al.* (2010), utilizaram também quitosanas, dado o seu potencial biológico-funcional já descrito previamente na literatura, biodisponibilidade e biocompatibilidade. Contudo, sugeriram outras modificações para além da hidrólise simples, como por exemplo o aumento de grau de deacetilação dos quitooligossacarídeos, que já tinham dado bons sinais de si em ensaios com ratos naturalmente hipertensos, provando ser capazes de inibir não só a ECA mas também a renina, que é o ponto de controlo da reacção de conversão do precursor hepático angiotensinogénio em angiotensina-II.

O modelo de inibição da ECA por parte de péptidos e proteínas já foi proposto, enquanto a nível dos polissacarídeos o conhecimento é bem mais restrito, pelo que não foi possível determinar exactamente o modelo de inibição, embora o padrão obtido sugira uma inibição competitiva da ECA na presença do inibidor. Quanto ao peso molecular, não foi observada uma diferença significativa de actividade inibitória para as quitosanas, o que pode indicar que nesta situação o peso molecular não tem uma importância tão grande como em

outras actividades biológicas. Contudo, ainda são necessários estudos mais aprofundados antes de se poder confirmar esta hipótese [Park *et al.*, 2003; Wijesekara *et al.*, 2010].

▪ 3.1.7. Actividade Imunomoduladora:

De momento, encontra-se reportada em vários estudos a possibilidade de os polissacarídeos sulfatados apresentarem actividade imunomoduladora, isto é, capacidade para estimular o sistema imunitário. Embora a maior parte destes estudos tenham sido feitos com polissacarídeos sulfatados provenientes de outras algas marinhas, nomeadamente carragenanas e fucoïdanas, o ulvano também já foi analisado [Karnjanapratum *et al.*, 2011; Leiro *et al.*, 2007; Wijesekara *et al.*, 2011].

Regra geral, os estudos até agora efectuados evidenciam este efeito maioritariamente sobre os macrófagos, células pertencentes à componente inata do sistema imunitário, resultantes da diferenciação dos monócitos a partir do momento em que estes atravessam o endotélio vascular. Os macrófagos são células muito versáteis e têm um papel muito importante no equilíbrio da função imunitária, devido à sua capacidade de realizar diferentes funções consoante o tecido e as circunstâncias. Os macrófagos são células com capacidade para eliminar microrganismos patogénicos por fagocitose, apresentar antigénios a linfócitos, mediando assim a actividade imunitária adquirida, e têm um papel vital na resposta inflamatória, através do estímulo, regulação e supressão, devido às suas capacidades de produzir citoquinas. Além disso, existem macrófagos colocados em locais estratégicos do organismo para contribuírem na resposta imediata a uma invasão por parte de um patogénico, devido à sua capacidade fagocítica e mediadora tais como as células de Kupfer no fígado e as células de microglia no tecido nervoso [Arosa *et al.*, 2007; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Leiro *et al.*, 2007; Wijesekara *et al.*, 2011]. Além da estimulação directa dos macrófagos, existem estudos que evidenciam actividade de regulação destas células, o que se reveste de particular importância para evitar respostas inflamatórias exageradas ou crónicas – a cronicidade infecciosa é apontada como um factor que pode influenciar o aparecimento de tumores; e o estímulo da produção do factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) por parte de certos tipos de leucócitos [Leiro *et al.*, 2007; Wijesekara *et al.*, 2011].

Um dos motivos pelos quais o ulvano pode ser considerado como bastante promissor como imunomodulador é a sua semelhança com glucosaminoglicanos que ocorrem naturalmente no organismo, tais como o hialuronano e o sulfato de condroitina, compostos estes semelhantes a alguns produzidos por monócitos, macrófagos e linfócitos B, assim como o facto de o ulvano conter ramnose, que é um açúcar típico de bactérias [Leiro *et al.*, 2007].

Para avaliar a influência do ulvano sobre o sistema imunitário, Leiro *et al.* (2007), procederam a uma série de ensaios *in vitro* utilizando o polissacarídeo extraído de acordo com as condições descritas na Tabela 2.1., e purificado em seguida tendo em vista a

desproteção do extracto. Os ensaios incidiram na capacidade de o ulvano actuar sobre os macrófagos, pelo que foi utilizada uma linha celular de macrófagos de rato denominada RAW264.7.

Os ensaios efectuados e respectivos objectivos encontram-se descritos na seguinte tabela [Karnjanapratum *et al.*, 2011; Leiro *et al.*, 2007]:

Tabela 3.2. Ensaios efectuados por Leiro *et al.*, 2007 para análise de actividade imunomoduladora do ulvano.

Ensaio	Metodologia	Objectivo	Resultados principais
Produção de óxido nítrico (NO)	Reacção de Griess	NO participa em vários eventos associados à resposta inflamatória	Aumento efectivo da síntese de NO directamente proporcional à concentração de ulvano
Produção de PGE ₂	Ensaio imunoenzimático de inibição competitiva	As prostaglandinas são mediadores importantes da resposta inflamatória	Aumento efectivo da síntese de PGE ₂ directamente proporcional à concentração de ulvano
Expressão dos genes responsáveis pelas enzimas NOS-2 e COX-2	Isolamento de RNA, síntese de cDNA e amplificação por PCR	NOS-2 (Sintetase de óxido nítrico) e COX-2 (Ciclooxigenase) são enzimas que estão envolvidas respectivamente na síntese de NO e PGE ₂	Aumento da expressão dos genes associados a estas enzimas numa relação directamente proporcional à concentração de ulvano
Expressão de genes associados a citoquinas	Isolamento de RNA, síntese de cDNA e aplicação em Kit Microarray	Análise dos mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos se estimulados pelo ulvano	Estimulação significativa de vários genes, demonstrando potencial de activação dos macrófagos

Os resultados obtidos por Leiro *et al.* (2007) demonstram uma efectiva actividade imunomoduladora do ulvano sobre os macrófagos RAW264.7. através do aumento da síntese de compostos importantes na resposta inflamatória, como o óxido nítrico e as prostaglandinas, assim como várias citoquinas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Karnjanapratum *et al* (2011)., no seu estudo com polissacarídeos extraídos de *M.nitidum*.

Os resultados demonstraram que o ulvano aumentava a expressão dos genes responsáveis pela síntese das enzimas NOS-2 e COX-2, num efeito directamente proporcional à concentração de ulvano utilizada, tal como referido acima na Tabela 3.2. Isto explica a maior produção de óxido nítrico e de prostaglandinas. O óxido nítrico é extremamente importante na resposta inflamatória, pois está envolvido na sua regulação e exerce um papel importante na mediação da actividade fagocítica. As prostaglandinas, nomeadamente a prostaglandina E₂ analisada no ensaio, é também um mediador importante que influencia células do sistema imune tão variadas como macrófagos, linfócitos ou células NK no início da resposta inflamatória. No ensaio de hibridização em microarray, os resultados foram bastante

diversificados, até devido á quantidade de genes testados, mas mesmo assim bastante interessantes, pois observou-se uma expressão claramente maior por parte de ligandos de alguns mediadores envolvidos no desencadear da resposta inflamatória no momento da lesão, assim como de moléculas reguladoras do movimento de diversos tipos de leucócitos. Um exemplo é o aumento da expressão do receptor β -1 para a interleucina 12, existentes em células de origem hematopoiética, como células NK, linfócitos T activados, células dendríticas e células de microglia [Arosa *et al.*, 2007, Karnjanapratum *et al.*, 2011; Leiro *et al.*, 2007].

Uma conclusão importante que se pode retirar do estudo de Leiro *et al.* (2007), é o facto de os polissacarídeos terem perdido grande parte da sua capacidade de estimulação dos macrófagos quando modificados de forma a remover os seus grupos sulfato. Este resultado já tinha sido observado em ensaios feitos com ulvano em fagócitos de peixes, e verifica-se também com polissacarídeos sulfatados provenientes de outras algas marinhas, tais como o porfirano. O facto de se ter utilizado o ulvano na sua forma nativa leva á hipótese de, sendo esta molécula muito grande para atravessar a membrana celular dos macrófagos, a sua actuação seja exercida sobre receptores presentes na membrana, e que os grupos sulfato possam ter um papel-chave nessas interacções. Resultados semelhantes foram também observados com carragenanas [Leiro *et al.*, 2007; Wijesekara *et al.*, 2011]. Contudo, são necessários mais estudos a nível químico-estrutural para corroborar este mecanismo, até devido á heterogeneidade que estes polissacarídeos apresentam [Karnjanapratum *et al.*, 2011].

Todas estas hipóteses são bastante promissoras e deixam a porta aberta a novos estudos. Tal como referido acima, o ulvano apresenta semelhanças estruturais com glucosaminoglicanos como o sulfato de condroitina, produzidos por macrófagos em situações de resposta inflamatória e por leucócitos polimorfonucleares após a fagocitose, que são também agentes importantes na mediação da resposta imune e na síntese de citoquinas, pelo que esta função poderá ser brevemente alvo de estudo. Não é de excluir também a potenciação desta actividade através da hidrólise [Arosa *et al.*, 2007, Courtois, 2009; Karnjanapratum *et al.*, 2011; Leiro *et al.*, 2007].

▪ 3.1.8. Aplicações Biomédicas:

A investigação na área dos biomateriais tem avançado a um ritmo muito elevado nos últimos anos, em grande parte devido ao cada vez maior investimento na pesquisa de propriedades dos polímeros naturais, devido á sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e biodisponibilidade. De entre estes polímeros, salientam-se os polissacarídeos das algas, como o ulvano e o alginato, que têm grandes vantagens relativamente aos polissacarídeos de origem animal devido á minimização dos riscos de imunogenicidade e de transmissão de doenças [Alves *et al.*, 2012, Toskas *et al.*, 2011, Toskas *et al.*, 2012].

Uma das aplicações biomédicas muito estudada em tempos recentes é a criação de materiais que possam ser utilizados para preenchimento e tratamento de feridas. Dependendo da tipologia da ferida, pode ser vantajoso utilizar um composto capaz de actuar nos tecidos, seja de forma directa, seja como veículo para outro aumentar a biodisponibilidade de um fármaco naquele local, pelo que Alves *et al.* (2012) procederam a um conjunto de ensaios para avaliação destas propriedades no ulvano.

Na literatura está já descrito que os polissacarídeos ricos em ramnose têm capacidade anti-inflamatória, protegem a pele da radiação UV, da adesão bacteriana e de lesões relacionadas com o envelhecimento, e estimulam a proliferação celular e a biossíntese do colagénio. No caso do ulvano, sabe-se também que é um agente heparinóide, o que torna este polissacarídeo mais atractivo devido à conhecida importância vital da heparina no processo de cicatrização. A versatilidade estrutural do ulvano deixa em aberto a capacidade de preparação de hidrogéis que podem ser suplementados com fármacos que podem assim ser aplicados sobre a ferida e, em conjunto com o hidrogel em si, actuar melhor tendo em vista uma melhor cicatrização [Alves *et al.*, 2012].

Alves *et al.* (2012) demonstraram que o ulvano tem efectivamente potencial neste campo, quer através da promoção directa da cicatrização – actuando como agente heparinóide, isto é, um promotor da proliferação de fibroblastos e mediador químico no processo de coagulação, impedindo-o; e capaz de interagir com várias moléculas da matriz extracelular – quer como agente de transporte de fármacos, capacidade essa que se revelou muito promissora e cujos ensaios correram de acordo com o esperado.

Outra utilização do ulvano para aplicações biomédicas (não só tratamento de feridas e agente de transporte, mas também na engenharia de tecidos propriamente dita) é a construção de matrizes de nanofibras. Toskas *et al.* (2011), aplicaram o conhecimento previamente existente relativo ao fabrico de nanofibras a partir de polímeros naturais ao ulvano, por forma a encontrar uma nova matriz, rentável, segura e prática. Para o fabrico de nanofibras, a técnica de electro rotação encontra-se já descrita em estudos prévios e, para contrariar a elevada viscosidade do ulvano, foi desencadeada a mistura da solução do polissacarídeo com outro polímero de ligação, tendo-se concluído que o mais promissor seria o álcool polivinílico (PVA).

O fabrico de nanofibras nestas condições permitiu a obtenção de um produto final com uma distribuição de diâmetro que atingiu valores detectáveis de 84 nm. Os testes efectuados demonstram que existe uma boa interacção iónica entre o PVA e o ulvano, o que confere um potencial bastante promissor a estas fibras, não só no campo biomédico mas também para ajudar a compreender outras propriedades já mencionadas. Em hipótese estão combinações com outros polímeros para reforço da integridade mecânica das fibras e diversificação das suas aplicações. É também vital estudar a bioactividade e biocompatibilidade destes compostos [Toskas *et al.*, 2011].

Para preenchimento de feridas, Toskas *et al.* (2011), estudaram uma matriz combinada usando ulvano, devido às propriedades evidenciadas nos estudos recentes, e quitosana, um polissacarídeo de elevado peso molecular resultante da deacetilação da quitina, e que se pode encontrar nas carapaças de crustáceos. A quitosana tem sido alvo de inúmeros estudos ao longo dos anos, e entre as suas propriedades destacam-se a biodegradabilidade, ausência de toxicidade, potenciação da cicatrização, estimulação da actividade de macrófagos e potencial antimicrobiano (Cunha *et al.*, 2012) Há já algum tempo que a quitosana vem sendo estudado para preenchimento de feridas, principalmente em complexos com alginato ou celulose, mas devido ao potencial evidenciado pelo ulvano, foi estudada a combinação deste com a quitosana [Toskas *et al.*, 2011].

A combinação destes dois polímeros, de carga oposta (o ulvano tem carga negativa devido aos grupos sulfato e carboxilo, e a quitosana carga positiva), originou a formulação de estruturas supramoleculares estáveis, através das interações electrostáticas estabelecidas. A estrutura desta combinação assemelha-se a uma membrana de nanofibras, capaz de mimetizar a componente fibrosa da matriz extracelular. Quando testado com uma cultura celular de osteoblastos 7F2, de rato, foi observada uma situação de confluência clara, semelhante àquela que ocorre na presença de titânio, um dos materiais mais usados para suporte de propagação de osteoblastos. O resultado obtido com as fibras de ulvano e quitosana foi claramente mais vantajoso que o obtido com as membranas compostas por cada um dos polímeros em separado, o que sugere que a combinação do ulvano com outros componentes semelhantes pode aumentar o seu potencial no campo biomédico, entre outros [Toskas *et al.*, 2012].

A aplicação biomédica do ulvano demonstrou um elevado potencial, embora mais estudos sejam necessários para corroborar estes resultados. Sabe-se desde já que nesta situação, é de vital importância a utilização de ulvano na sua forma mais purificada (assim como qualquer outro componente), para que não haja qualquer interferência de contaminantes [Alves *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2012, Toskas *et al.*, 2011, Toskas *et al.*, 2012].

➤ **3.2. Propriedades Tecnológicas:**

▪ **3.2.1. Potencial de bioadsorção de metais pesados:**

Na actualidade, existe cada vez mais sensibilidade para a problemática da poluição e da preservação ambiental. O desenvolvimento industrial, entre outros, contribuiu largamente para a libertação para o meio ambiente de enormes e diversas quantidades de poluentes, nos quais se incluem os metais pesados (note-se que a designação metais pesados é amplamente usada, inclusive na literatura científica, mas não tem propriamente uma base científica, sendo

utilizada de forma comum para definir compostos metálicos susceptíveis de induzir toxicidade, principalmente a nível ambiental) [Areco *et al.*, 2012; Duffus, 2002].

Assim sendo, a investigação científica tem-se concentrado em encontrar maneira de combater a contaminação, maioritariamente em águas e solos; assim como prevenir o aumento desta através do tratamento de resíduos e efluentes industriais. Para esta tarefa, o potencial de alguns organismos vivos, nomeadamente plantas e microrganismos, tem vindo a ser documentado, e a biorremediação, isto é, eliminação da toxicidade recorrendo a organismos vivos é já uma realidade. Se para correcção de solos, a utilização de plantas com potencial de fitorremediação já é praticada; no que se refere a efluentes industriais contendo metais altamente tóxicos, a utilização de microrganismos ainda está a ser investigada, sendo que se utilizam maioritariamente métodos físico-químicos, tais como a filtração com resinas de troca iónica ou recorrendo à adsorção em carvão activado. Contudo, as algas têm revelado um potencial de bioadsorção bastante promissor, o que pode mudar o conceito de tratamento de águas residuais [Areco *et al.*, 2012].

O potencial existente nas algas deve-se essencialmente aos polissacarídeos presentes nas suas paredes celulares. Estes polímeros têm diferentes grupos funcionais, com respectivas afinidades para iões metálicos, variáveis consoante o pH, o que permite a bioadsorção dos metais contaminantes à matriz biológica, que pode depois ser tratada para anular a toxicidade. Assim, a utilização de massas de algas mortas para bioadsorção apresenta várias vantagens, não só devido à sua elevada capacidade de bioadsorção, como também a elevada biodisponibilidade, fácil manipulação e utilização, o que contribui para tornar este método como uma técnica económica, eficiente e ambientalmente sustentável [Areco *et al.*, 2012].

O estudo feito por Areco *et al.* (2012) utilizou *Ulva lactuca* para estudar a capacidade de bioadsorção de alguns dos principais poluentes denominados como metais pesados: Cobre (II), Cádmiio (II), Chumbo (II) e Zinco (II). Procedeu-se à extracção da alga, tal como referido no Capítulo 1.1., por forma a obter um pó, com partículas de tamanho inferior a 125 µm, para ser utilizado como matriz biológica, tanto em suspensão, como compactado em colunas de eluição ou fixo em agar. A eficácia da alga como bioadsorvente e a comparação entre os diferentes métodos foi feita recorrendo a vários métodos de química analítica, assim como a microscopia electrónica de varrimento, para análise da matriz biológica. Os resultados obtidos permitiram concluir que a *U.lactuca* pode constituir efectivamente uma matriz biológica eficaz para bioadsorção dos metais acima referidos, pois revelou elevado potencial nos ensaios praticados com soluções feitas em laboratório. Os vários testes analíticos demonstraram uma diminuição da quantidade de metais tóxicos nas águas, após a passagem pela matriz biológica, e a análise microscópica desta comprovou a presença dos iões metálicos na superfície das partículas de *U.lactuca*. Foi igualmente registado que o pH afecta o potencial de bioadsorção, e que existem diferenças quanto a bioadsorção dos diferentes metais, consequência das diferentes afinidades dos grupos funcionais presentes nos polissacarídeos da parede celular para cada metal. De notar que os melhores resultados de remediação foram obtidos com as partículas em

suspensão, o que leva a crer que a incorporação das partículas em agar bloqueie alguns grupos funcionais responsáveis pelo processo [Areco *et al.*, 2012].

Pese embora esteja a ser considerado um único estudo nesta aplicação consequência da sua natureza emergente e escassez de literatura científica associada, pode considerar-se que a utilização de matrizes derivadas de algas com elevado teor em polissacarídeos, como a *Ulva lactuca*, pode ser uma forma alternativa, economicamente viável e ambientalmente sustentável de tratar águas contaminadas e efluentes industriais [Areco *et al.*, 2012]. Yaich *et al.* (2011), corroboram indirectamente este estudo pois, ao analisar as propriedades da alga *Ulva lactuca* colhida na costa da Tunísia, demonstraram que esta, embora tendo propriedades promissoras do ponto de vista biológico, não poderia ser usada para consumo humano devido às elevadas concentrações de metais pesados, tais como manganês, chumbo, cobre e cádmio; de notar que o local donde foram colhidas estas algas era particularmente poluído com estes metais pesados.

▪ 3.2.2. Utilização em técnicas de melhoramento de culturas vegetais:

Com a contínua necessidade de aumentar a produção de alimentos devido ao crescimento da população global, tem-se vindo a investir cada vez mais na protecção e melhoramento das culturas vegetais. Contudo, ainda há muito trabalho a fazer, dado que muitas doenças e pragas que afectam as plantas cultivadas com fins alimentares ainda não são passíveis de um combate eficaz, ou então são utilizados fungicidas e pesticidas que, ao longo dos anos, são causadores de danos ambientais muito consideráveis e susceptíveis de originar processos de bioacumulação e de alteração grave dos ecossistemas [El Modafar *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012; Paulert, 2005]. Se excluirmos os factores climáticos e humanos, os grandes inimigos das culturas são as pragas, nomeadamente de insectos (larvas de borboletas, escaravelhos, gafanhotos.) e as doenças causadas por bactérias, mas essencialmente por vírus, virióides e fungos. Uma doença bastante conhecida e que causa avultados prejuízos a nível mundial é a antracnose do feijão, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. O processo de patogénese deste fungo pode ser observado na Figura 3.4. [Freitas *et al.*, 2012; Paulert, 2005]:

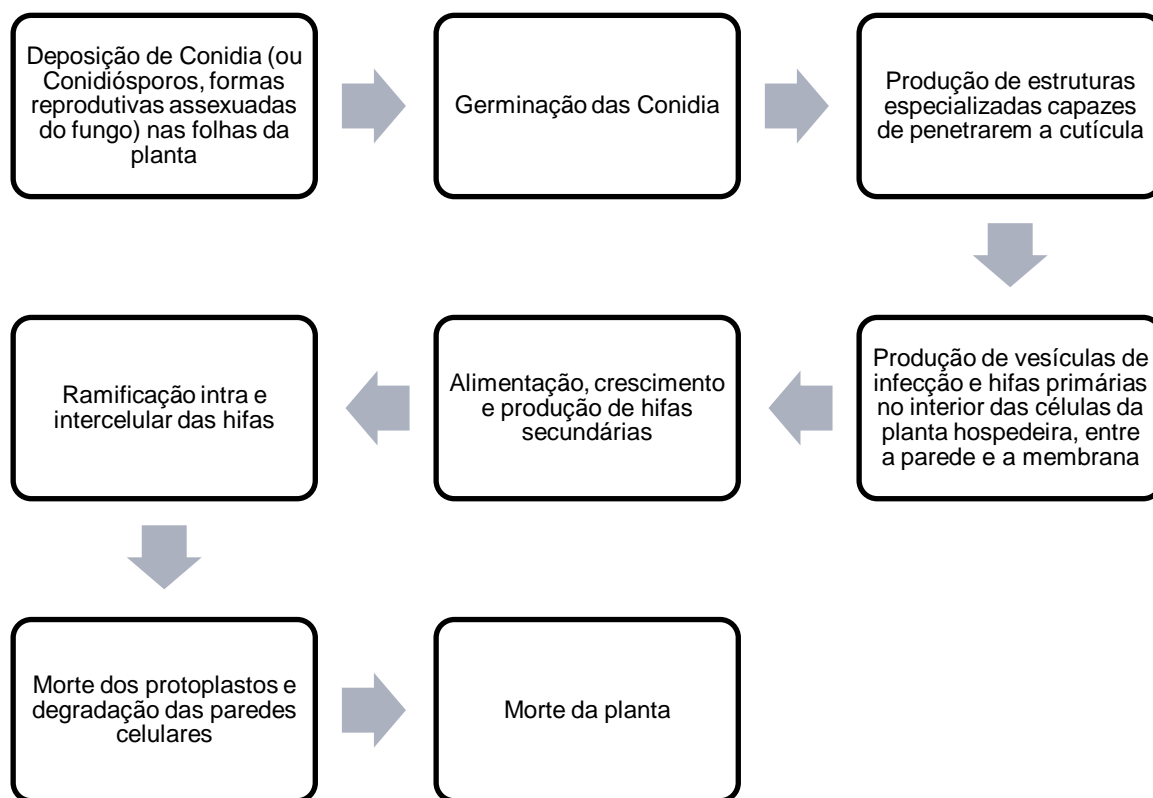


Figura 3.4. Processo de patogênese do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

A antracnose do feijoeiro é uma doença bastante difícil de combater devido a vários factores, dos quais se destacam [Freitas *et al.*, 2012]:

- Elevada variabilidade genética do patogénico, demonstrado por vários estudos realizados no Brasil, que indicam que estão continuamente a aparecer novas variedades;
- Sobrevivência do patogénico em detritos da cultura, logo apresenta uma boa resistência;
- Transmissão eficaz pelas sementes;

Tal como todas as plantas, o feijoeiro também tem os seus mecanismos de defesa naturais, que proporcionam diferentes linhas de ataque em caso de infecção com o fungo. Os mecanismos são muito variados [Freitas *et al.*, 2012]:

- Produção de radicais livres de oxigénio (ROS), tais como peróxido de hidrogénio;
- Reforço da parede celular;
- Síntese de fitodexinas;

- Produção de proteínas ligadas ao processo de patogénese, como a peroxidase (que usa o peróxido de hidrogénio produzido durante a resposta imune para lenhificar a parede celular) e a glucanase (que degrada os polímeros de β -1,3-glucanos, que são dos maiores componentes da parede celular dos fungos);
- Resposta hipersensível, em que ocorre morte rápida e escurecimento das células epidermais afectadas pouco depois da invasão, por forma a isolar o local infectado do resto da planta e impedir a propagação da doença (geralmente esta resposta ocorre em plantas com resistência específica a dadas variantes do fungo);

O combate humano a esta doença é feito essencialmente de duas formas: utilização de fungicidas e cultivo de variedades/cultivares resistentes de feijoeiro. Está descrito que a resistência de certas cultivares contra determinadas variedades do fungo é conferida por um conjunto de genes, tendo sido identificados até ao momento 13 genes de resistência, denominados genes *Co*. Contudo, a variabilidade enorme do patogénico faz com que existam cada vez menos cultivares resistentes, enquanto o uso de fungicidas, além da indução de mais resistências por parte do fungo, causa danos ambientais graves. Tudo isto contribui para aumentar os danos nas culturas e, conseqüentemente as perdas e os custos de produção, pelo que se têm investigado novos métodos de combate à antracnose, entre os quais se destaca a utilização de polissacarídeos sulfatados provenientes de algas marinhas, como o ulvano [Freitas *et al.*, 2012; Paulert, 2005].

Estudos prévios demonstraram que o ulvano tem capacidade para combater uma gama variada de doenças vegetais, tais como outros tipos de antracnose, ferrugem, míldio e manchas nas folhas causadas por patogénicos, assim como de induzir a resistências nas plantas, potenciando as defesas tanto em monocotiledóneas como em dicotiledóneas [Freitas *et al.*, 2012].

Os estudos realizados com o ulvano aplicado à antracnose do feijoeiro não foram conclusivos, mas mesmo assim demonstraram que existe potencial, porém mais ensaios terão que ser feitos para o comprovar. Efectivamente, demonstrou-se que o tratamento específico para cada variante e o tratamento com ulvano não afectam a germinação de *Conidia* nem a formação de estruturas de invasão, assim como não potenciam a resposta hipersensível; pelo contrário, observou-se que existe potenciação da produção de enzimas, nomeadamente da glucanase (enquanto que a peroxidase só foi estimulada em plantas já resistentes). Foi também reportado, pela primeira vez, o aumento das defesas enzimáticas das plantas através do tratamento com um polissacarídeo antes da infecção, o que confere ainda mais um potencial promissor à utilização do ulvano para combate à antracnose do feijoeiro [Freitas *et al.*, 2012; Paulert, 2005].

Este estudo, tal como outros efectuados com polissacarídeos sulfatados provenientes de algas marinhas, abriu caminho para que estes compostos começassem a ser referenciados

como alvo de estudo para substituir os pesticidas, através do reforço do sistema de defesas da planta, actuando como um agente profilático. A maior parte dos estudos realizados baseados neste modelo foram feitos com vários compostos, e só recentemente é que os polissacarídeos se destacaram, embora mais uma vez não tenham sido feitos grandes estudos de referência com algas verdes. O incremento da pesquisa sobre o ulvano levou a que este composto fosse testado tendo em vista a indução de defesas em plantas independentemente da existência de uma infecção prévia, tal como se pode comprovar no estudo de El Modafar *et al.* (2012). Neste estudo, os investigadores procederam ao isolamento dos dois polissacarídeos principais provenientes da alga *Ulva lactuca*, os glucoronanos e o ulvano; e também à hidrólise de ambos, tendo em vista a comparação dos efeitos profiláticos na planta do tomateiro, dada a importância económica e o conhecimento das doenças e pragas sobre esta planta. O ulvano demonstrou capacidade de activação na enzima PAL (Fenilalanina-amónia liase, E.C. 4.3.1.5), que é uma enzima-chave na activação das defesas do tomateiro, assim como de estímulo de produção de compostos fenólicos, conhecidos por serem uma das vias mais comuns de resposta por parte das plantas. O procedimento de hidrólise e a análise comparativa da eficácia do ulvano e seus oligossacarídeos para estes objectivos encontra-se descrito, respectivamente, em 4.1.1. e 4.2.6. [El Modafar *et al.*, 2012].

▪ 3.2.3. Aplicações Ambientais:

Até ao momento, a maior parte das massas de *Ulva* sp. recolhidas nas costas são utilizadas como adubo nos campos, composto, ou então são eliminadas. Contudo, as enormes quantidades que têm dado á costa em vários pontos do globo, como por exemplo na Bretanha colocam problemas graves de gestão de resíduos, pelo que alguns investigadores procederam a estudos para avaliar a possível rentabilização destas massas de algas para fins energéticos [Ale, 2012; Bruhn *et al.*, 2011; Peu *et al.*, 2011].

Investigações prévias tinham já demonstrado que a degradação anaeróbia de *Ulva* sp. em condições controladas tinha potencial de produção de biogás, contendo nomeadamente metano e dióxido de carbono; contudo, a produção não era em elevadas quantidade e a sazonalidade de aparecimento das massas de algas impedia a sua utilização de forma rentável. Além disso, o conteúdo elevado em gás sulfídrico (H₂S) seria um problema devido á sua toxicidade. Alguns estudos de co-digestão com outros resíduos usados em meios rurais, como estrume de porcos foram efectuados na tentativa de avaliar a diminuição do impacto da produção de gás sulfídrico, mas os resultados não foram positivos, dado que se continuou a verificar uma baixa taxa de metanogénese e a presença de quantidades significativas de gases tóxicos [Peu *et al.*, 2011].

Bruhn *et al.* (2011), procederam a uma avaliação do potencial bioenergético da *Ulva lactuca* e, embora o resultado tenha sido promissor, colocam-se bastantes desafios

relativamente á sua aplicação efectiva, dado que para um produto ser bioenergeticamente eficaz, devo obedecer a alguns parâmetros dos quais se destacam:

- Elevada taxa de crescimento;
- Baixo custo (baixa necessidade energética e nutritiva, fácil manutenção);
- Propriedades intrínsecas adequadas;

Resumidamente, a *U.lactuca* apresentou um excelente desempenho no que concerne ao primeiro parâmetro, e relativamente ao segundo, alguns estudos seriam necessários mas os resultados revelaram-se extremamente promissores. Também não é de excluir, tal como referido acima, a utilização para fins bioenergéticos das massas de algas que dão á costa, mas a sua sazonalidade e possível impacto ambiental são entraves para a produção contínua de energia. Contudo, as propriedades intrínsecas da *U.lactuca* demonstram ser o principal problema para este aproveitamento, dado que o elevado teor em cinzas e compostos alcalinos não permite extrair um bom rendimento da biomassa. A fermentação de *U.lactuca* a etanol não apresentou valores rentáveis, provavelmente devido ao elevado teor em ramosse do polissacarídeo [Lahaye *et al.*, 2007]; enquanto a conversão em metano é considerada como razoavelmente promissora, mas a elevada quantidade de água e a produção de gás sulfídrico, tal como descrito por Peu *et al.* (2011) não permitem a rentabilização desta metodologia. Assim, é recomendada a utilização da biomassa disponível para extracção de produtos, como o ulvano; e aplicação em bioremediação (ver 3.2.1.) [Bruhn *et al.*, 2011].

▪ 3.2.4. Outras Aplicações:

Para além de todas as propriedades referidas acima, estima-se que o ulvano possa ter um conjunto bem mais alargado de aplicações. Está descrito na literatura científica que muitos dos polissacarídeos derivados de algas, principalmente os polissacarídeos sulfatados podem ser utilizados como agentes espessantes e gelificantes na indústria alimentar, sendo que de momento entre os espessantes encontrados no mercado incluem-se polímeros como o alginato, agar e carragenanas, cujos processos de colheita, extracção e produção já se encontram optimizados, pelo que a investigação destas propriedades no ulvano não será considerada prioritária [Ramnani *et al.*, 2012]. Contudo, existem outras propriedades encontradas noutros polissacarídeos sulfatados que podem vir a ser estudadas no ulvano. Destacam-se as fucoidanas, que foram já referidos como agentes estimulantes de diferenciação de osteoblastos, pelo que podem vir a ser incluídos em suplementos nutritivos para a saúde óssea; protectores da mucosa gástrica, podendo vir a ser aplicados como alimentos funcionais anti-úlceras e protectores de envelhecimento da pele em cosméticos devido á inibição de metaloproteinasas activadas pela radiação ultravioleta B; entre outros [Wijesekara *et al.*, 2011]. Assim, e partindo da mesma análise comparativa com que este estudo foi elaborado, pode dizer-se que a gama de propriedades do ulvano é certamente muito mais alargada do que a referida neste trabalho.

Capítulo IV – O Ulvano e os seus Derivados:

➤ 4.1. Estratégias de Modificação:

▪ 4.1.1. Hidrólise:

O processo de hidrólise de polissacarídeos derivados de algas pode ser feito através de várias metodologias, as quais ainda não estão muito desenvolvidas no que concerne à Divisão *Chlorophyta*, e em particular ao ulvano. As metodologias podem agrupar-se basicamente em três grupos: físicas (ex: utilização de radiação), químicas (ex: hidrólise ácida) e enzimáticas (ex: recurso a liases bacterianas), cuja análise será feita neste capítulo. Devido à falta de estudos feitos até ao momento para o ulvano, recorreu-se em certas situações a uma análise comparativa, através do estudo de outro polissacarídeo sulfatado com semelhanças químio-estruturais. De notar que muitos estudos já realizados evidenciam que os hidrolisados de polissacarídeos possuem uma gama de propriedades mais alargada, maioritariamente devido ao seu menor peso molecular, que lhes confere uma maior versatilidade e capacidade de interacção a nível celular [Courtois, 2009; El Modafar *et al.*, 2012; Kazlowski *et al.*, 2012; Lahaye *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003; Ramnani *et al.*, 2012].

• 4.1.1.1. Métodos Físicos:

Nos ensaios para avaliação da actividade antihiperlipidémica do ulvano, Yu *et al.* (2003)., procederam à hidrólise do polissacarídeo através da degradação a alta pressão no micro-ondas, de acordo com a Figura 4.1.

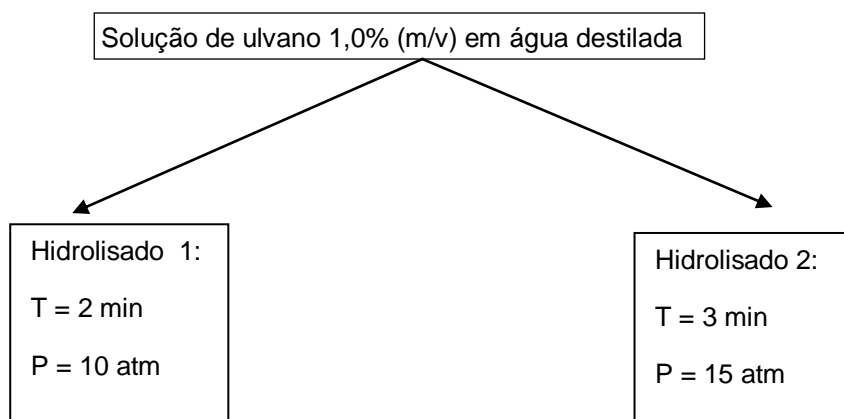


Figura 4.1. Hidrólise do ulvano segundo Yu *et al.*, 2003.

As amostras foram de seguidas arrefecidas à temperatura ambiente e liofilizadas. Na pesquisa efectuada até ao momento, não se encontraram mais referências a métodos físicos de hidrólise de polissacarídeos, em particular do ulvano. A análise dos resultados obtidos através da aplicação desta metodologia para os ensaios de detecção de actividade antihiperlipidémica encontram-se descritos em 4.2.4. [Yu *et al.*, 2003].

- **4.1.1.2. Métodos Químicos:**

Nos ensaios de avaliação da actividade prebiótica efectuados com agar e alginato, Ramnani *et al.*, 2012; propuseram a utilização de dois métodos: a hidrólise ácida, recorrendo a ácido acético 1 M, agitação contínua a quente (80 °C) e posterior neutralização com hidróxido de potássio 5 M; e a utilização de peróxido de hidrogénio, também com agitação contínua a quente (80 °C). O peso molecular dos hidrolisados é de seguida avaliado por cromatografia de exclusão molecular.

- **4.1.1.3. Métodos Enzimáticos:**

As enzimas são um dos conjuntos de proteínas mais estudados, devido á sua quase infinita gama de aplicações e também á sua diversidade; como tal, o estudo das suas propriedades, mecanismo e especificidade é uma área em contínuo desenvolvimento. Existem muitos mecanismos de actuação de enzimas, mas muitas delas regem-se por uma grande especificidade, tanto no que se refere ao substrato com o qual interagem, como no próprio mecanismo inter e intra molecular de acção. Posto isto, a hidrólise de ulvano com recurso a enzimas cujo mecanismo de acção é conhecido permite a obtenção de oligossacáridos cuja estrutura será aproximadamente conhecida [Lehninger *et al.*, 2004].

No seu ensaio sobre a actividade antiviral (ver **3.1.3.** e **4.2.3.**), Kazlowski *et al.* (2012) procederam á hidrólise das suas amostras recorrendo a duas agarases microbianas (MA103 e MAEF108), e os hidrolisados separados e purificados por cromatografia de exclusão molecular de alta performance (HPSEC). No ensaio, os polissacarídeos com massa molecular superior a 50 kDa foram usados como grupo comparativo de elevado peso molecular, enquanto os obtidos da hidrólise com graus de polimerização de 6, 24 e 30 foram catalogados como tendo baixo peso molecular. Como controlos, foi utilizada agarose para o controlo negativo, visto ser muito semelhante aos polissacarídeos de *Gracillaria* sp., mas sem sulfatos; e como controlo positivo a heparina. Em ambos os controlos, utilizaram-se hidrolisados com os mesmos graus de polimerização das amostras. As amostras e os hidrolisados não apresentavam contaminação com polifenóis e proteínas, nem citotoxicidade até uma concentração de 100 g/mL, embora alguns tivessem promovido um ligeiro crescimento celular.

A pesquisa de enzimas com alguma especificidade para o ulvano é um facto relativamente recente, e mais recentes são os resultados dessas mesmas pesquisas. De momento, sabe-se que a maior parte das enzimas que actuam sobre os polissacarídeos da família a que pertence o ulvano, os ácidos poliglucorónicos, são liases de polissacarídeos (EC 4.2.2.x) que reconhecem os ácidos urónicos e fazem a clivagem da ligação β ou α -(1,4) [Collén *et al.*, 2011; Lahaye *et al.*, 1997; El Boutachfai *et al.*, 2011; Fer *et al.*, 2012].

Em estudos anteriores, já haviam sido identificadas algumas liases com esta acção sobre o ulvano, provenientes de bactérias Gram negativas presentes em algas em decomposição [Lahaye *et al.*, 1997]. Contudo, a caracterização das enzimas e das espécies

baceterianas produtoras ainda não tinha sido feita em detalhe, pelo que nas bases de dados científicas ainda não se encontravam dados de relevo sobre bactérias ulvanolíticas. Uma pesquisa alargada permitiu a identificação de uma bactéria com estas propriedades, *Persicivirga ulvanivorans*, pertencente à família *Flavobacteriaceae*, Filo *Bacteroidetes*; isolada das fezes do gastrópode *Aplysia punctata*, após alimentação com *Ulva* sp., culminando no estudo de Collén *et al.*, 2011; utilizado como principal referência no presente capítulo. Outro estudo, elaborado por El Boutachfaiti, tinha já descoberto outra bactéria, *Ochrobactrum* sp. estirpe PEC2; embora não tenha sido encontrada uma caracterização tão alargada [Collén *et al.*, 2011; El Modafar *et al.*, 2012].

Collén *et al.*, 2011; procederam à extracção e caracterização do ulvano a partir de *Ulva* rotundata, tal como descrito em 2.2., por forma a obter uma amostra com um bom grau de pureza para ser usado nos ensaios bacteriológicos. Para análise da degradação do ulvano, foi efectuada a incubação de *P.ulvanivorans* (estirpe DSM 22727) nas condições adequadas, seguida da adição de ulvano ao meio, para estimular a produção das liases extracelulares. O sobrenadante foi em seguida filtrado, submetido a um tratamento de precipitação com sulfato de amónia e a vários passos de cromatografia de troca iónica e de afinidade hidrofóbica, para recolha da fracção protéica, procedendo-se a uma electroforese SDS-PAGE para separação e purificação da fracção protéica e a quantificação pelo Método de Bradford. As proteínas obtidas pelo processo de electroforese foram isoladas e tratadas para posterior análise por espectrometria de massa (LC-MS/MS), sendo que os resultados desta análise foram em seguida comparados com bases de dados para detecção de homologias com outras proteínas, e também foi efectuada uma sequenciação dos péptidos a partir dos resultados obtidos. Foram efectuados também ensaios de clonagem em plasmídeos, estudos enzimáticos e análises detalhadas por cromatografia e espectroscopia de ressonância magnética nuclear para caracterização dos oligoulvanos.

Após a análise detalhada de todos os resultados, foi possível obter uma liase com um peso molecular correspondente a 46 kDa, cuja análise estrutural e genética demonstrou ser composta por dois módulos, um módulo catalítico com cerca de 30 kDa e outro módulo cujas funções se desconhecem. A existência do módulo catalítico foi comprovada pela sua expressão recombinante em *E.coli* após clonagem [Collén *et al.*, 2011].

A análise bioinformática não permitiu encontrar proteínas semelhantes a esta liase em bases de dados de sequências, nem se provaram semelhanças com as famílias de liases mais conhecidas. A análise detalhada do oligossacarídeo purificado demonstrou que esta liase actua especificamente por clivagem da ligação glicosídica localizada entre os resíduos de ácido idurónico ou glucorónico e a ramnose sulfatada. Presume-se que a acção da enzima seja endolítica, dado que o peso molecular da amostra de ulvano decaiu rapidamente após o início da reacção [Collén *et al.*, 2011].

Como a biomassa de *Ulva* sp. é uma componente importante dos ecossistemas marinhos, presume-se que existam vários organismos capazes de degradar o ulvano, tal como se verifica na bioconversão das massas de outras algas pertencentes a outras divisões, tais como o agar, fucoidanas, carragenanas e alginatos; sendo que novas famílias de proteínas com estas funções têm sido descobertas continuamente. Presume-se também que a degradação do ulvano a açúcares envolva muitas outras enzimas, devido á grande complexidade deste polissacarídeo. A investigação efectuada também evidenciou que a bactéria *P.ulvanivorans* não é capaz de crescer com o ulvano como única fonte de carbono, pelo que mais estudos são necessários para aumentar o conhecimento sobre o sistema enzimático envolvido na degradação destas algas, assim como as relações entre as diferentes bactérias associadas a este processo [Collén *et al.*, 2011].

O estudo de Collén *et al.*, representa um grande passo na descoberta de enzimas capazes de degradar polissacarídeos provenientes de algas verdes, nomeadamente ulvanos, sendo que estas enzimas, depois de devidamente caracterizadas, poderão ser utilizadas para a obtenção de oligossacarídeos, que serão em seguida testados para avaliação das propriedades referidas acima, assim como para novas propriedades, multiplicando assim o campo de acção do ulvano e seus derivados [Fer *et al.*, 2012].

▪ 4.1.2. Modificação Química por Adição de Grupos Iónicos:

De acordo com o referido em 3.1.5., Qi *et al.* (2012) procederam à preparação de derivados de ulvano com maior teor em sulfatos, através da adição de um agente de sulfatação, o complexo dimetilformamida-trióxido de enxofre (SO₃-DMF). O teor em sulfatos foi em seguida determinado pelo Método de gelatina-cloreto de bário, e foram efectuadas análises espectroscópicas de FTIR e ¹³C RMN nos derivados [Qi *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2012]. Se no ulvano nativo o teor de sulfatos, segundo Qi *et al.*, 2005; foi de 19,5%; após este tratamento com SO₃-DMF foram obtidas moléculas de ulvano altamente sulfatadas com um teor deste grupo iónico a variar entre 23,5 e 32,8%, de acordo com a temperatura de reacção e a fracção molar de ulvano/ SO₃-DMF utilizada.

Qi *et al.* (2012) procederam também a ensaios em que o polissacarídeo na sua forma nativa foi modificado tendo em vista a adição de grupos acetil e benzoil, através do Método de Tosh *et al.* (2000). O produto resultante desta reacção foi de seguida liofilizado e analisado por FTIR, ¹H RMN e ¹³C RMN, para estudo das posições de substituição, tendo-se concluído mediante a observação dos espectros que o processo de acetilação foi bem sucedido, embora sejam necessários estudos posteriores para definir as posições de substituição.

Tal como descrito previamente, os principais objectivos destas modificações residem na potenciação das propriedades biológicas do ulvano, em particular da actividade antioxidante e antihiperlipidémica, no que concerne aos estudos referidos nesta dissertação. Os ensaios

efectuados e o impacto das modificações nas referidas propriedades encontram-se descritos em 4.2.1. e 4.2.4. [Qi *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2003].

➤ **4.2. Impacto nas Propriedades Funcionais:**

▪ **4.2.1. Actividade Antioxidante:**

O estudo efectuado por Qi *et al.* (2012) com moléculas de ulvano com diferentes teores em sulfato corroborou a hipótese colocada anteriormente da importância dos grupos sulfato nas propriedades funcionais deste tipo de polissacarídeos.

Foi observado que o ulvano efectivamente possui actividade antioxidante moderada, e que nos ensaios efectuados os ulvanos com um maior teor em sulfatos apresentavam claramente maior actividade – como exemplo, para uma concentração de 50 µg/ml, a variação entre o ulvano nativo e o ulvano com maior teor em sulfatos (correspondente a 32,8%, tal como descrito em 4.1.2.) aumentou cerca de 20% no ensaio de detecção do radical superóxido; e cerca de 45% no ensaio de detecção do radical hidroxilo [Qi *et al.*, 2005]. Contudo, ainda são necessários mais estudos para compreender melhor os mecanismos de acção destes polissacarídeos e a sua performance *in vivo*, assim como a segurança dos métodos de adição de grupos sulfatos para uso humano [Qi *et al.*, 2005; Wijesekara *et al.*, 2011].

Por sua vez, os ensaios efectuados com as moléculas de ulvano acrescidas de grupos acetil ou benzoil evidenciaram também uma potenciação desta actividade relativamente ao polissacarídeo na sua forma nativa. O mecanismo de acção destes grupos ainda não é totalmente conhecido, embora se proponha que a neutralização dos radicais livres se deva a um mecanismo de transferência de prótons. Observou-se ainda que o ulvano substituído com grupos acetil tinha uma actividade antioxidante ainda maior que o ulvano acrescido de grupos sulfato na concentração máxima testada, embora o comportamento das moléculas nos diferentes ensaios fosse diferente consoante os grupos adicionados (acetil ou benzoil) [Qi *et al.*, 2006; Wijesekara *et al.*, 2011].

Ensaio efectuado com outras algas, por exemplo, *Laminaria japonica* demonstraram que a actividade antioxidante dos oligossacarídeos era mais elevada que a do polissacarídeo nativo, pelo que se pode propor a hipótese que esta tipologia de acção seja válida também para o ulvano, o que implicará estudos futuros [Wang *et al.*, 2010; Wijesekara *et al.*, 2011].

▪ **4.2.2. Actividade Antiproliferativa/Anticarcinogénica:**

Até ao momento, não foram encontrados estudos de avaliação de actividade anticarcinogénica com derivados de ulvano. Contudo, e tal como referido em várias ocasiões, a potenciação desta actividade através da hidrólise do polissacarídeo nativo é uma hipótese em

aberto, que deverá ser alvo de estudos em breve. Estudos efectuados com outros polissacarídeos sulfatados, como fucoidanas, demonstraram precisamente que a hidrólise moderada do composto pode aumentar significativamente a actividade antiproliferativa *in vitro* [Wijesekara *et al.*, 2011].

▪ 4.2.3. Actividade Antiviral:

Tal como descrito em 3.1.3., Kazlowski *et al.* procederam a um ensaio de actividade antiviral, utilizando não só os polissacarídeos na sua forma nativa mas também os respectivos hidrolisados, obtidos de forma descrita em 4.1.1. e obtiveram alguns resultados bastante interessantes.

No estudo, foi demonstrado que os polissacarídeos com peso molecular entre 1000 e 500000 Da inibem a replicação dos vírus de RNA, mas não foram eficazes para o vírus da encefalite japonesa, e a actividade viral aumenta proporcionalmente ao peso molecular, até atingir um valor óptimo de cerca de 40 kDa. Deduziu-se que os polissacarídeos interferiam com a replicação viral na fase inicial do ciclo, dado que esta só pode ser bloqueada no momento da adsorção aos receptores celulares, e o mecanismo proposto foi o de neutralização das cargas positivas das glicoproteínas do envelope e acumulação de cargas negativas, o que impede as interacções electrostáticas entre o vírus e as células. Este mecanismo pode explicar a eficácia dos polissacarídeos sulfatados para a maioria dos vírus de envelope [Kazlowski *et al.*, 2012].

A grande dificuldade encontrada no estudo foi a baixa absorção dos polissacarídeos (que atingia valores de 1%), ao contrário dos seus hidrolisados, o que pode explicar a existência de uma relação proporcional até um peso óptimo, sendo que a partir daí os compostos tornam-se demasiado grandes para a absorção ser eficaz. Tal como esperado, não foi encontrada citotoxicidade; pelo que se pode considerar que os polissacarídeos provenientes de algas marinhas são fontes promissoras de compostos com actividade antiviral e podem ter efeito profilático contra a infecção por parte de alguns agentes, como por exemplo a encefalite japonesa [Kazlowski *et al.*, 2012].

▪ 4.2.4. Actividade Antihiperlipidémica/Antihipercolesterolémica:

Tal como descrito em 3.1.5., Yu *et al.*, procederam a ensaios alimentares em ratos com hidrolisados de ulvano para avaliar a capacidade destes de diminuir as concentrações de colesterol no sangue, e comparar a performance dos hidrolisados com o ulvano, inferindo sobre a influência do peso molecular nas propriedades biológicas deste. O processo de hidrólise foi feito de acordo com a Figura 4.1., referida em 4.1.1.

Com os hidrolisados de ulvano, verificou-se uma diminuição da viscosidade no lúmen intestinal, o que afecta a relação com os sais biliares, pois não há tanto impacto no processo digestivo nem na capacidade de reabsorção. Além disso, verificou-se que, tanto no Hidrolisado 1 (P = 10 atm, T = 2 min) como no Hidrolisado 2 (P = 15 atm, T = 3 min), ocorreu um aumento de HDL, diminuição dos triglicéridos, mas também um aumento de LDL e do colesterol total, o que sugere que existe um mecanismo indeterminado, provavelmente relacionado com a viscosidade ou com o peso molecular, que interfere com o processo digestivo e de reabsorção [Yu *et al.*, 2003].

O aumento do valor de colesterol total e de LDL está relacionado com o processo de biossíntese de colesterol, pois estudos prévios efectuados com algas demonstraram que estes valores poderiam ser aumentados pelo facto de os polissacarídeos induzirem um aumento da síntese de colesterol no fígado. Este aumento leva à diminuição do número de receptores para as LDL nos tecidos periféricos, que em última instância leva ao aumento da concentração sérica de quilomícrons, detectados na análise juntamente com os LDL. Assim, mais estudos são vitais para avaliar as diferentes interacções estabelecidas pelo polissacarídeo na sua forma nativa e hidrolisada para potenciar as suas actividades [Yu *et al.*, 2003].

No caso da dislipidemia diabética, caracterizada por um aumento de triglicéridos e diminuição de HDL, os dois hidrolisados contrariam esta tendência, tal como referido acima e, principalmente para o hidrolisado 2, os resultados foram extremamente promissores para esta doença, e melhores até do que os obtidos com o polissacarídeo nativo [Yu *et al.*, 2003].

Qi *et al.* demonstraram que o ulvano na sua forma nativa e o ulvano com grupos sulfato adicionais induzem aumento de peso nos ratos, embora não seja significativo relativamente aos controlos. Neste estudo, foi evidenciada uma maior actividade antihiperlipidémica para os derivados do ulvano e, embora não tenha sido possível encontrar uma correlação com a concentração, provou-se a influência do teor em sulfatos na potenciação desta propriedade – por exemplo, para uma dose das amostra de concentração correspondente a 250 mg/kg fornecida aos animais, foi obtida uma diminuição da concentração de triglicéridos de 28% e para as LDL de 28,3%, mantendo-se estáveis os valores de HDL. Relativamente às moléculas de ulvano acetiladas, verificou-se a mesma conclusão para as moléculas de ulvano com maior teor em sulfatos no aspecto do peso dos ratos, isto é, induziu um aumento não significativo, e um reforço na acção antihiperlipidémica, particularmente no que concerne às moléculas de LDL e triglicéridos por parte do ulvano acetilado relativamente ao polissacarídeo nativo.

Tal como Yu *et al.*, 2003, Qi *et al.* observaram nos seus sucessivos estudos, o efeito do ulvano e derivados nos triglicéridos e nas várias lipoproteínas é muito variável, pelo que estudos mais aprofundados são necessários nesta área. As hipóteses propostas por estes autores estão de acordo com as referidas por Yu *et al.*, ou seja, o mecanismo de redução do colesterol consiste no sequestro de sais biliares e redução substancial da circulação enterohepática, levando o organismo a degradar o colesterol em excesso. Yu *et al.* propõem

também uma correlação entre a actividade antioxidante e a actividade anti hiperlipidémica. Qi *et al.*, por sua vez, mencionam a importância dos grupos sulfato e dos grupos acetil na potenciação da actividade antihiperlipidémica, através das interacções iónicas estabelecidas pelos grupos sulfato e também de interacções proporcionadas por substituintes hidrofóbicos como os grupos acetil. Contudo, ambos os estudos são claros em afirmar que mais ensaios são necessários por forma a ter maior conhecimento do mecanismo de acção do ulvano sobre as partículas lipídicas, e a interacção em particular de alguns grupos.

▪ 4.2.5. Actividade Prebiótica:

As algas são conhecidas pela sua elevada quantidade de fibras, que pode atingir até cerca de 75% do seu peso seco e que são maioritariamente solúveis, o que lhes confere um enorme potencial a nível nutricional. Destas fibras, destaca-se a componente polisacáridica, como os alginatos e fucoidanos nas algas castanhas, carragenanas, agar e porfiranas nas algas vermelhas e o ulvano nas algas verdes. A maior parte destes polissacarídeos são bastante completos, tal como discutido acima para o ulvano, e são regra geral resistentes às enzimas do Tracto Gastro-Intestinal (TGI), podendo ou não formar géis de alguma viscosidade no intestino e ser fermentadas pela flora intestinal normal. Assim sendo, para além do potencial nutricional, existe potencial prébiótico por parte destes polissacarídeos [Ramnani *et al.*, 2012].

Ramnani *et al.* (2012) utilizaram nos seus ensaios agar e alginato mas, tal como dito anteriormente, estes polissacarídeos são demasiado complexos e têm um peso molecular demasiado elevado para estarem tempo suficiente no intestino e serem metabolizadas pela flora normal, pelo que se torna necessário encontrar formas de reduzir estas fibras a compostos de menor peso molecular e com maior solubilidade, para avaliar o seu potencial prébiótico, procedendo-se à sua hidrólise tal como descrito em 4.1.1.2. [Ramnani *et al.*, 2012]. Os oligossacarídeos daí resultantes podem ser adicionados aos produtos alimentares, procedendo-se em seguida a um conjunto de baterias de testes para avaliar se não há alterações às propriedades sensoriais do alimento [Ramnani *et al.*, 2012]. Contudo, ainda há pouca informação sobre o comportamento destes oligossacarídeos derivados de algas, tanto a nível químico como funcional, comparativamente aos prébióticos mais usados, como a inulina e os galactoligossacarídeos [Courtois, 2009; Ramnani *et al.*, 2012].

Para a realização do estudo, Ramnani *et al.*, 2012; procederam à recolha de amostras fecais, que foram em seguida diluídas em PBS e homogeneizadas e inoculadas no vaso de cultura, num modelo de condições de fermentação intestinal controladas, em batch. Para avaliar a actividade prebiótica dos hidrolisados de agar e alginato, foram efectuados ensaios de fluorescência *in situ* (FISH), recorrendo a nucleótidos específicos para quantificar a população bacteriana total e a de certos grupos com relevância na actividade intestinal; e de análise por cromatografia gasosa de produtos da fermentação (a fermentação microbiana pode ser avaliada a partir do perfil de produção de ácidos orgânicos ou seus derivados), como o acetato,

propionato, isobutirato, valerato, butirato, isovalerato e caproato [Ramnani *et al.*, 2012]. Como controlos, foi utilizada a inulina como controlo positivo, dado o seu potencial prébiótico amplamente descrito na literatura científica; e a celulose como controlo negativo por não ter qualquer actividade prébiótica [Ramnani *et al.*, 2012]. Contudo, os resultados a nível da actividade prébiótica obtidos por Ramnani *et al.*, 2012; para os oligossacarídeos de agar e alginato foram, ao contrário de estudos anteriores com outros compostos, claramente inferiores aos obtidos para o controlo positivo, o que não anula o facto de efectivamente existir um potencial promissor, dado terem sido obtidas conclusões interessantes.

A análise dos perfis de fermentação revelou uma degradação significativa de todos os oligossacarídeos, convertidos na sua grande maioria a acetato e propionato. A produção de ácido acético é comum à maioria das bactérias anaeróbias do TGI, mas a produção de propionato reveste-se de maior importância porque outros estudos demonstram potencial antihipercolesterolemico por parte deste composto. Relativamente à celulose e aos polissacarídeos não hidrolisados, confirmou-se o esperado, isto é, a taxa de degradação é baixa devido à sua complexidade, o que pode ser corroborado por vários estudos prévios [Ramnani *et al.*, 2012].

Há que acrescentar alguns pormenores sobre estes resultados, que têm que ser levados em conta em estudos futuros, inclusive para o avaliar o potencial de oligossacarídeos derivados do ulvano. Em primeiro lugar, as estimativas da flora bacteriana baseadas no perfil de fermentação são falíveis, devido à diversidade de espécies presentes no cólon, assim como à complexidade do ambiente no lúmen intestinal, que não é fácil de reproduzir, e às interações e sinergias que podem ocorrer entre as diferentes espécies bacterianas. Além disso, sabe-se que a flora intestinal possui um grande conjunto de enzimas que actuam sobre oligossacarídeos (CAZimas), metabolizando-os. Existe informação sobre a actuação destas enzimas nas fibras derivadas de plantas, mas no caso das algas, ainda há muito pouca coisa – outros estudos indicam a possibilidade de existirem enzimas desta tipologia que degradam hidratos de carbono de algas, produzidas por bactérias dos grupos *Bacteroides* e *Prevotella*, que já de si são um grupo muito numeroso e enzimaticamente versátil [Ramnani *et al.*, 2012].

O que este e outros estudos efectuados com outras algas permite afirmar é que existe um potencial bastante promissor de actividade prébiótica por parte de oligossacarídeos derivados de algas, mas que ainda há muito a fazer, em particular no caso de hidrolisados de ulvano, tal como descrito em 4.1.1.

▪ 4.2.6. Utilização em Técnicas de Melhoramento de Culturas Vegetais:

Tal como descrito em 3.2.2., El Modafar *et al.* procederam a um estudo sobre a capacidade de o ulvano e seus hidrolisados induzirem as defesas das plantas independentemente da presença de um patogénico, usando para tal a planta do tomateiro.

Para avaliar a sua potencialidade como bioinsecticidas, El Modafar *et al.* analisaram a actividade da enzima fenilalanina-amónia liase (PAL, E.C. 4.3.1.5.), uma enzima-chave na via defensiva desta planta, e a presença de compostos fenólicos típico dos sistemas naturais de defesa vegetais.

O estudo efectuado efectivamente provou que o ulvano foi capaz de induzir uma actividade da enzima PAL semelhante ou superior aos outros polissacarídeos conhecidos por esta propriedade, tais como o carragenano, alginato e laminarina, assim como da presença de compostos fenólicos. Ficou demonstrado que, dos dois polissacarídeos maioritários presentes em *U.lactuca*, glucoronano e ulvano; foi o ulvano que apresentou actividade significativa como estimulante das defesas da planta. Quando foi analisada a actividade de ulvano cujos grupos sulfato foram removidos quimicamente, esta não se verificou, o que leva a propor que os grupos sulfato têm um papel determinante na actividade de biopesticida deste e de outros polissacarídeos, tal como estudos prévios já haviam demonstrado. É também proposto que o elevado teor em ramnose, comum em lipopolissacrídeos bacterianos, também pdoe estar envolvido neste processo [El Modafar *et al.*, 2012].

Os oligossacarídeos obtidos através da degradação com as liases obtidas da estirpe seleccionada de *Ochrobactrum* sp. evidenciaram uma actividade significativamente mais elevada do que o polissacarídeo na sua forma nativa (cerca de 250% mais elevada relativamente ao controlo), pelo que esta actividade, tal como outras mencionadas anteriormente, pode ser significativamente potenciada através do estudo detalhado dos procedimentos de hidrólise do ulvano [El Modafar *et al.*, 2012].

Ficou também demonstrado que a resposta induzida pelo ulvano e respectivos oligossacarídeos era sistémica, pois verificou-se em locais da planta que não tinham sido estimulados pelo polímero. A resposta sistémica está associada à produção de ácido salicílico, que actua como mediador na resposta sistémica das plantas a patogénicos, e pode ser condicionada pelo aumento da actividade da enzima PAL. Sabe-se que a indução da resposta sistémica aumenta significativamente as defesas da planta a insectos, nemátodos, fungos, bactérias e vírus; e ficou demonstrado que o ulvano e derivados eram capazes de diminuir claramente a mortalidade das plantas do tomateiro quando estas foram infectadas com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Este estudo demonstra assim o potencial do ulvano e dos seus hidrolisados para melhoramento de culturas, assim como para minimizar os danos ambientais através da diminuição da utilização de pesticidas, embora mais estudos sejam necessários para a utilização maciça destes compostos no mercado [Courtois, 2009; El Modafar *et al.*, 2012].

Capítulo V – Pesquisa de Mercado:

Para complementar esta investigação sobre o ulvano, procedeu-se a um levantamento de mercado por produtos à base de ulvano ou de algas pertencentes à Família *Ulviceae*. Dado ser um polissacarídeo que só se tornou num alvo de estudo não há muito tempo, e que só nos últimos dez anos é que têm surgido estudos mais avançados sobre as suas propriedades, não seria de esperar encontrar este composto no mercado.

Em primeiro lugar, foi efectuada uma pesquisa na internet, que não apresentou resultados credíveis e de relevo, tanto em Portugal como no estrangeiro. De seguida, procedeu-se a averiguações em sete lojas de produtos dietéticos, macrobióticos e ervanárias na cidade do Porto, com o objectivo de falar com os assistentes e, se possível; com os responsáveis pelos estabelecimentos comerciais, por forma a receber algum feedback sobre os produtos existentes, suas aplicações, prespectivas de negócio, assim como recolha de folhetos e outras informações. Esta pesquisa que corroborou a hipótese inicial, isto é, de momento, não deve haver produtos à base de ulvano ou das algas pertencentes à Família *Ulviceae* no mercado.

Contudo, este levantamento permitiu a recolha de informações bastante interessantes, relativas aos produtos à base de macroalgas encontrados nos estabelecimentos acima indicados. Os resultados da pesquisa estão resumidos na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Quadro-resumo do levantamento de mercado efectuado no Concelho do Porto.

Nome Comum	Designação Taxonómica	Divisão	Classificação por Cor	Tipo de Produto	Qde de Produtos
Alface-do-mar	<i>Ulva</i> sp.	<i>Chlorophyta</i>	Verde	0	0
Wakame/Mekabu	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Phaeophyta</i>	Castanha	Alga seca	7
Dulse	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Rhodophyta</i>	Vermelha	Alga seca	2
Esparguete do Mar	<i>Eisenia arborea</i>	<i>Phaeophyta</i>	Castanha	Alga seca	3
Kombu	<i>Saccharina japónica/Laminaria japónica</i>	<i>Phaeophyta</i>	Castanha	Alga seca	6
				Cápsulas	2
				Pó	1
Nori	<i>Porphyra</i> sp.	<i>Rhodophyta</i>	Vermelha	Alga seca	6
Agar-Agar	<i>Gelidium</i> sp./ <i>Gracilaria</i> sp. (maioritariamente)	<i>Rhodophyta</i>	Vermelha	Alga seca	6
				Gelatina	2
				Flocos	1
Bodelha	<i>Fucus vesiculosus</i>	<i>Phaeophyta</i>	Castanha	Chá	3
				Cápsulas	4

Tabela 5.1. (Continuação).					
Nome Comum	Designação Taxonómica	Divisão	Classificação por Cor	Tipo de Produto	Quantidade de Produtos
Arame	<i>Eisenia bicyclis</i>	<i>Phaeophyta</i>	Castanha	Alga seca	1
Hijiki	<i>Sargassum fusiforme</i>	<i>Phaeophyta</i>	Castanha	Alga seca	2
Musgo da Irlanda	<i>Chondrus crispus</i>	<i>Rhodophyta</i>	Vermelha	Cápsulas	1
Produtos à base de combinados de algas				Chá	1
				Cápsulas	2
				Massas	2
				Bebidas	2
				Sopas	1
				Arroz	1

Esta tabela evidencia que a venda de macroalgas marinhas está amplamente difundida em estabelecimentos comerciais na área dos produtos naturais, com particular incidência para as algas Wakame, Kombu, Nori, Agar-Agar e Bodelha. Observa-se também uma ampla gama de produtos, que vão desde a alga seca propriamente dita, para ser utilizada na cozinha como suplemento alimentar, ou em cozinha vegetariana e macrobiótica; às cápsulas, usadas maioritariamente para fins dietéticos ou também como suplemento nutricional; assim como produtos contendo combinados apenas de algas, ou de algas e outras espécies vegetais. A existência de uma diversidade tão grande de produtos com diferentes aplicações neste nicho de mercado pode indicar que a introdução do ulvano é viável, embora em Portugal não esteja tão difundida a utilização de produtos naturais e macrobióticos como noutros países da Europa ou no Brasil. Para tal, seriam necessários estudos de mercado mais aprofundados tendo em vista parâmetros como a rentabilidade e áreas de aplicação preferenciais.

De realçar também que, das algas encontradas, nenhuma tinha uma proximidade taxonómica com a *Ulva* sp., embora algumas das algas citadas acima, nomeadamente a *Laminaria japónica* e *Gracillaria* sp., constem da pesquisa bibliográfica realizada para a elaboração deste trabalho, devido à proximidade estrutural dos seus polissacarídeos, respectivamente fucoidanos e agar [Kazlowski *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010].

Considerações Finais:

A revisão bibliográfica dos estudos efectuados até ao momento sobre o ulvano revelou-se bastante positiva, dado que foram encontrados resultados bastante promissores.

Embora o estudo das algas verdes esteja atrasado comparativamente às outras divisões das macroalgas, é possível observar que se tem registado um aumento significativo dos mesmos nos últimos anos, o que se traduz num conhecimento cada vez mais alargado sobre o ulvano. O conhecimento da estrutura físico-química do ulvano é já bastante bom, embora ainda existam lacunas relativas a algumas particularidades deste polímero, dada a sua enorme complexidade e variabilidade. Têm também sido cada vez mais optimizados os métodos de extracção do ulvano a partir de *Ulva* sp. e também formas de obter um extracto o mais puro possível, o que é cada vez mais relevante devido ao potencial biomédico, farmacológico e nutricional, entre outros, deste polissacarídeo.

No que se refere às suas propriedades funcionais, o ulvano ainda é uma molécula muito pouco estudada, e pode considerar-se que, comparado com outros polissacarídeos sulfatados provenientes de algas marinhas, apenas uma pequena porção do potencial do ulvano foi devidamente estudado. Contudo, os resultados obtidos, tanto com o ulvano em si, como com polissacarídeos com semelhanças químico-estruturais demonstram um potencial enorme, que poderá ser aumentado quando o conhecimento a nível químico for melhorado, dado que ainda não se conhecem a maior parte dos mecanismos moleculares responsáveis pelas propriedades do ulvano. Mesmo assim, existem desde já algumas noções bastante importantes que reúnem consenso: em primeiro lugar, a importância dos ácidos urónicos e, em principalmente dos grupos sulfato nas propriedades demonstradas. Vários estudos evidenciaram já que os grupos sulfato são determinantes na maioria das propriedades estudadas, e que a sua supressão levava à perda das mesmas, enquanto um incremento no teor em sulfatos pode contribuir para um aumento das capacidades biológicas do ulvano. Em segundo lugar, está determinado que o elevado peso molecular do ulvano é uma condicionante para muitas interacções a nível celular, tal como acontece com outros polissacarídeos, pelo que o estudo da hidrólise se torna extremamente importante.

Sabe-se, a partir dos estudos com polissacarídeos similares, que a hidrólise pode potenciar as actividades funcionais e até originar novas. A investigação no que concerne a hidrólise do ulvano está ainda muito no início, embora recentemente tenham sido descobertas algumas enzimas, pertencentes à categoria das liases, capazes de degradar o polissacarídeo. Estas descobertas permitem o desenvolvimento de novos estudos, embora a caracterização das enzimas, mecanismos de actuação e interacção entre enzimas e microrganismos ainda seja um fenómeno cuja investigação ainda está numa fase inicial.

Este estudo permitiu demonstrar que o ulvano e os seus oligossacarídeos são moléculas com elevadíssimo potencial biológico e tecnológico-industrial, potencial esse

reforçado pela elevada biodisponibilidade das algas pertencentes a *Ulva* sp. A sua utilização torna-se mais interessante quando se sabe que o aparecimento excessivo destas massas de algas é um problema crescente, pelo que este excedente pode ser aproveitado e convertido em algo positivo. De salientar entre as propriedades do ulvano a capacidade antioxidante, anticoagulante, antiproliferativa, imunomoduladora, antihiperlipidémica, biomédica e a sua utilização como biopesticida e biorremediador, além da utilização comum em alguns países como suplemento nutricional.

O levantamento de mercado efectuado demonstrou que, de momento, não deve haver produtos à base de ulvano no mercado, dado que os estabelecimentos comerciais inquiridos foram alguns dos mais reconhecidos na especialidade no Concelho do Porto. Contudo, ficou por demais evidente que o mercado dos produtos naturais, e em particular, das algas; tem o seu lugar e que há uma enorme diversidade, pelo que se pode afirmar que o ulvano, a provarem-se as suas promissoras propriedades, poderá entrar neste nicho de mercado a médio prazo.

Conclusão unânime em todos os estudos analisados, e que se aplica inteiramente a este trabalho, é que o ulvano é uma molécula com muito potencial, mas mais estudos são necessários para melhorar o conhecimento sobre ela e sobre os mecanismos por trás das suas propriedades.

Futuramente, é necessário aprofundar a caracterização físico-química do ulvano, o que por sua vez pode permitir saber mais sobre os mecanismos bioquímicos que condicionam as suas propriedades. Este conhecimento é vital para que se possa progredir, não só em ensaios *in vitro* como também para ensaios *in vivo*, por forma a aplicar o ulvano em áreas tão diversificados como a biomédica e a farmacêutica. O aprofundar do conhecimento de propriedades como a antioxidante e a prebiótica pode também ajudar a lançar o ulvano no mercado, dado ser reforçada a importância desta alga como suplemento alimentar, o que irá certamente aumentar a rentabilidade.

O aproveitamento do excedente biológico da alface-do-mar pode ser feito também com ênfase na área ambiental, o que não implica tantas fases de ensaios. A utilização desta alga, devido aos su polissacarídeo maioritário, para tratamento de águas contaminadas com metais pesados pode ser uma excelente forma de aproveitar a versatilidade do composto em questão.

Para finalizar, a recente descoberta de enzimas ulvanolíticas permite aprofundar o conhecimento e testar novas formas de hidrólise do ulvano que, à imagem do que ocorre com outros polissacarídeos sulfatados, pode ser uma forma de potenciar as propriedades do ulvano e cujas referências na literatura científica são ainda bastante reduzidas.

* Referências bibliográficas:

- Ale, M. T. 2012. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweed: Extraction technology and biological activity assessment [Tese de doutoramento]. Technical University of Denmark: Lyngby, 139 pp. Disponível: Technical University of Denmark; ISBN 978-87-92481-70-2.
- Arosa, F. and E.Cardoso. 2007. Fundamentos de Imunologia, 2nd edition. Lidel – Edições Técnicas Lda., Portugal.
- Alves, A., Caridade, S., Mano, J., Sousa, R. and Reis, R. 2010. Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae. *Carbohydrate Research* **345**: 2194-2200.
- Alves, A., Pinho, E., Neves, N., Sousa, R. and Reis, R. 2012. Processing ulvan into 2D structures: Cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics* **426**: 76-81.
- Areco, M., Hanela, S., Duran, J. and Afonso, M.S. 2012. Biosorption of Cu(II), Zn (II), Cd (II) and Pb(II) by dead biomasses of green alga *Ulva lactuca* and the development of a sustainable matrix for adsorption implementation. *Journal of Hazardous Materials* **213-214**: 123-132.
- Boron, W. F. and Boulpaep, E. L. 2005. Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach. Elsevier Saunders, EUA.
- Brownlee, I. 2011. The physiological roles of dietary fibre. *Food Hydrocolloids* **25**: 238-250.
- Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H.B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M.B., Markager, S., Olesen, B., Arias, C. and Jensen, P.D. 2011. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresource Technology* **102**: 2595-2604.
- Collén, P.N., Sassi, J.F., Rogniaux, H., Marfaing, H. and Helbert, W. 2011. Ulvan Lyases Isolated from the Flavobacteria *Persicivirga ulvanivorans* Are the first Members of a New Polysaccharide Lyase Family. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 42063-42071.
- Collicq, S., Fischer, A., Tapon-Bretoniere, J., Boisson, C., Durand, P. and Jozefonvicz, J. 1991. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thrombosis Research* **64**: 143-154.

- Costa, C., Alves, A., Pinto, P., Sousa, R., Borges da Silva, E., Reis, R. and Rodrigues, A. 2012. Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydrate Polymers* **88**: 537-546.
- Costa, L., Fidelis, G., Cordeiro, S., Oliveira, R., Sabry, D., Câmara, R., Nobre, L., Costa, M., Almeida-Lima, J., Farias, E., Leite, E. and Rocha, H. 2010. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **64**: 21-28.
- Courtois, J. 2009. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology* **12**:261-273.
- Cunha, T., Teixeira, B., Santos, B., Almeida, M., Dias, G. and das Neves, J. 2012. Biological and Pharmacological Activity of Chitosan and Derivatives, in Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. John Wiley & Sons Ltd., UK.
- Dahlman, O., Jacobs, A., Liljenberg, A. and Olsson, A. 2000. Analysis of carbohydrates in wood and pulps employing enzymatic hydrolysis and subsequent capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **891**: 157-174.
- Duffus, J. 2002. "Heavy Metals" – A Meaningless Term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **74**: 793-807.
- El-Baky, H.A., El Baz, F. and El Baroty, G. 2009. Potential Biological Properties of Sulphated Polysaccharides Extracted from the Macroalgae *Ulva lactuca* L. *Academic Journal of Cancer Research* **2**: 01-11.
- El Boutachfaiti, R., Delattre, C., Petit, E. and Michaud, P. 2011. Polyglucuronic acids. Structures, functions and degrading enzymes. *Carbohydrate Polymers* **84**: 1-13.
- El Modafar, C., Elgadda, M., El Boutachfaiti, R., Abouraicha, E., Zehhar, N., Petit, E., El-Alaoui-Talibi, Z., Courtois, B. and Courtois, J. 2012. Induction on natural defence accompanied by salicylic acid-dependant systemic acquired resistance in tomato seedlings in response to bioelicitors isolated from green algae. *Scientia Horticulturae* **138**: 55-63.
- Fer, M., Préchoux, A., Leroy, A., Sassi, J.F., Lahaye, M., Boisset, C., Collén, P.N. and Helbert, W. 2012. Medium-throughput profiling method for screening polysaccharide-degrading enzymes in complex bacterial extracts. *Journal of Microbiological Methods* **89**: 222-229.

- Freitas, M. and Stadnik, M. 2012. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**: 8-13.
- Gião, M., González-Sanjosé, M., Rivero-Pérez, M., Pereira, C., Pintado, M. and Malcata, X. 2007. Infusions of Portuguese medicinal plants: Dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 2638-2647.
- Guiry, M.D. and Guiry, G.M. 2012. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível: <http://www.algaebase.org> [data de consulta: 02/05/2012].
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 1841-1856.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. and Ewart, H.S. 2011. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Marine Drugs* **9**: 196-223.
- Kamerling, J. and Gerwig, G. 2007. Strategies for the Structural Analysis of Carbohydrates. *Comprehensive Glycoscience – From Chemistry to Systems Biology* **2**: 1-68.
- Karadag, A., Ozcelik, B. and Saner, S. 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods* **2**: 41-60.
- Karnjanapratum, S. and You, S.G. 2011. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. *International Journal of Biological Macromolecules* **48**:311-318.
- Kazlowski, B., Chiu, Y., Kazlowska, K., Pan, C.L. and Wu, C.J. 2012. Prevention of Japanese encephalitis virus infections by low-degree polymerization sulfated saccharides from *Gracilaria* sp. and *Monostroma nitidum*. *Food Chemistry* **133**: 866-874.
- Lahaye, M. and Ray, B. 1996. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (*Ulva*, *Chlorophyta*) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides. *Carbohydrate Research* **283**: 1961-173.
- Lahaye, M., Brunel, M. and Bonnin, E. 1997. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (*Ulva*, *Chlorophyta*). *Carbohydrate Research* **304**: 325-333.

- Lahaye, M., Inizan, F. and Vigouroux, J. 1998. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. *Carbohydrate Polymers* **36**: 239-249.
- Lahaye, M. 1998. NMR spectroscopic characterization of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (*Ulvales*, *Chlorophyta*) degraded by a lyase. *Carbohydrate Research* **314**: 1-12.
- Lahaye, M. and Robic, A. 2007. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules* **8**:1765-1774.
- Lehninger, A., D. Nelson and M. Cox. 2004. Principles of Biochemistry, 4th edition. W.H Freeman & Co, EUA.
- Leiro, J., Castro, R., Arranz, J. and Lamas, J. 2007. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C.Agardh. *International Immunopharmacology* **7**: 879-888.
- MACOI – Portuguese Seaweeds Website. 2008. Disponível: <http://macoi.ci.uc.pt/default.php> [data de consulta: 03/07/2012].
- Madigan, M.T. and J.M. Martinko. 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11th edition. Pearson Prentice Hall, EUA.
- Mao, W., Zang, X., Li, Y. and Zhang, H. 2006. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied Phycology* **18**: 9-14.
- Mao, W., Li, H., Zhang, H., Qi, X., Sun, H., Chen, Y. and Guo, S. 2009. Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (*Chlorophyta*). *International Journal of Biological Macromolecules* **44**: 70-74.
- Mourão, P. and Pereira, M. 1999. Searching for Alternatives to Heparin: Sulfated Fucans from Marine Invertebrates. *Trends in Cardiovascular Medicine* **9**: 225-232.
- Ngo, D.H., Wijesekara, I., Vo, T.S., Van Ta, Q. and Kim, S.K. 2011. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International* **44**: 523-529.
- Pallister, C.J. and M.S. Watson. 2010. Haematology, 2nd edition. Scion Publishing, United Kingdom.
- Paradossi, G., Cavalieri, F., Pizzoferrato, L. and Liquori, A. 1999. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**: 309-315.

- Park, P.J., Je, J.Y. and Kim, S.K. 2003. Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Hetero-Chitooligosaccharides Prepared from Partially Different Deacetylated Chitosans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4930-4934.
- Paulert, R. 2005. Atividade Antimicrobiana e Controle da Antracnose do Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando Polissacarídeo e Extratos da Macroalga Marinha *Ulva fasciata*. [Tese de mestrado]. Universidade de Santa Catarina: Florianópolis, Brasil 107 pp.
- Pereira, M., Melo, F. and Mourão, P. 2002. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology* **12**: 573-580.
- Peu, P., Sassi, J., Girault, R., Picard, S., Saint-Cast, P., Béline, F. and Dabert, P. 2011. Sulphur fate and anaerobic biodegradation potential during co-digestion of seaweed biomass (*Ulva* sp.) with pig slurry. *Bioresource Technology* **102**: 10794-10802.
- Prior, R., Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4290-4302.
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X. and Li, Z. 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules* **37**: 195-199.
- Qi, H., Zhang, G., Zhao, T., Hu, R., Zhang, K. and Li, Z. 2006. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoyleated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**: 2441–2445.
- Qi, H., Huang, L., Liu, X., Liu, D., Zhang, Q. and Liu, S. 2012. Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Carbohydrate Polymers* **87**: 1637-1640.
- Qi, H., Liu, X., Zhang, J., Duan, Y., Wang, X. and Zhang, Q. 2012. Synthesis and antihyperlipidemic activity of acetylated derivative of ulvan from *Ulva pertusa*. *International Journal of Biological Macromolecules* **50**: 270-272.
- Ramnani, P., Chitarrari, R., Tuohy, K., Grant, J., Hotchkiss, S., Philp, K., Campbell, R., Gill, C. and Rowland, I. 2012. *In vitro* fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe* **18**: 1-6.

- Ray, B. and Lahaye, M. 1995. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (*Ulvales*, *Chlorophyta*). Extraction and chemical composition. *Carbohydrate Research* **274**: 251-261.
- Ray, B. and Lahaye, M. 1995. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (*Ulvales*, *Chlorophyta*). Chemical structure of ulvan. *Carbohydrate Research* **274**: 313-318.
- Robic, A., Sassi, J. and Lahaye, M. 2008. Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (*Chlorophyta*) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. *Carbohydrate Polymers* **74**: 344-352.
- Rumpunen, K., Thomas, M., Badilas, N. and Thibault, J.F. 2002. Validation of a Combined Enzymatic and HPLC Method for Screening of Pectins in Fruits of Japanese Quince (*Chaenomeles japonica*). *LWT-Food Science and Technology* **35**: 490-496.
- Sathivel, A., Raghavendran, H., Srinivasan, P. and Devaki, T. 2008. Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-Galactosamine induced hepatitis in rats. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 3262-3267.
- Stengel, D., Connan, S. and Popper, Z. 2011. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances* **29**: 483-501.
- Sundberg, A., Sundberg, K., Killandt, C. and Holmbom, B. 1996. Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. *Nordic Pulp and Paper Research Journal* **11**: 216-219.
- Tabatabai, M. 1974. Determination of sulfate in water samples. *Sulphur Institute* **10**: 11-13.
- Terho, T. and Hartiala, K. 1970. Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans. *Analytical Biochemistry* **41**: 471-476.
- Toskas, G., Hund, R.D., Laourine, E., Cherif, C., Smyrniotopoulos, V. and Roussis, V. 2011. Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva rigida*. *Carbohydrate Polymers* **84**: 1093-1102.
- Toskas, G., Heinemann, S., Heinemann, C., Cherif, C., Hund, R.D., Roussis, V. and Hanke, T. Ulvan and ulvan/chitosan polyelectrolyte nanofibrous membranes as a potential substrate material for cultivation of osteoblasts. *Carbohydrate Polymers* **89**: 997-1002.

- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Song, H. and Li, P. 2010. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules* **46**: 6-12.
- Wijesekara, I. and Kim, S.K. 2010. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prospects in the Pharmaceutical Industry. *Marine Drugs* **8**: 1080-1093.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R. and Kim, S.K. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* **84**: 14-21.
- Wu, J., Aluko, R. and Muir, A. 2002. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A* **950**:125-130.
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C. and Attia, H. 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry* **128**:895-901.
- Yu, P., Li, N., Liu, X., Zhou, G., Zhang, Q. and Li, P. 2003. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacological Research* **48**: 543-549.