

Artigo

Polissacarídeo Sulfatado da Esponja Marinha *Callyspongia vaginalis*

Araújo, R. D.; Caridade, T. N. S.; Araújo, R. M.*

Rev. Virtual Quim., 2018, 10 (5), 1446-1454. Data de publicação na Web: 10 de setembro de 2018

<http://rvq.sbq.org.br>**Sulfated Polysaccharide from the Marine Sponge *Callyspongia vaginalis***

Abstract: The literature reports several results of chemical investigations from marine ecosystems, which have showed molecules with great biological potential, therefore, its fauna and flora has been target of several studies. Among the marine organisms highlight the sponges, sessile animals, belonging to the poriferous phylum, a profitable source of micro and macromolecules such as polysaccharides, with several biological activities reported in the literature. The chemical investigation of *Callyspongia vaginalis* led to the isolation of a sulfated polysaccharide. Experiments of hydrolysis, reducing sugars, thermal stability, infrared, and ¹H NMR analyses were performed to characterize the polysaccharide. The ideal time for hydrolysis was 6 hours, presenting a concentration of 4.60 mg / mL of reducing sugar. The polysaccharide showed thermal stability up to about 200 °C. This is the first report of polysaccharide in the genus *Callyspongia*

Keywords: *Callyspongia vaginalis*; sulfated polysaccharide; polysaccharide analysis.

Resumo

A literatura apresenta diversos resultados de investigações químicas em ecossistemas marinhos, que têm apresentado moléculas com grande potencial biológico, por isso, sua fauna e flora tem sido alvo de diversos estudos. Dentre os organismos marinhos destacam-se as esponjas, animais sésseis, antigos, pertencentes ao filo porífera, fonte profícua de micromoléculas e macromoléculas como os polissacarídeos, com diversas atividades biológicas relatadas na literatura. A investigação química de *Callyspongia vaginalis* levou ao isolamento de um polissacarídeo sulfatado. Experimentos de hidrólise, de açúcares redutores, estabilidade térmica, infravermelho e RMN de ¹H foram realizadas para caracterização do polissacarídeo. O tempo ideal para hidrólise foi de 6 horas, apresentando uma concentração de 4,60 mg/mL de açúcar redutor. O polissacarídeo apresentou estabilidade térmica até cerca de 200 °C. Este é o primeiro relato de polissacarídeo no gênero *Callyspongia*.

Palavras-chave: *Callyspongia vaginalis*; polissacarídeo sulfatado; análise de polissacarídeo.

* Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto de Química, Laboratório de Isolamento e Síntese de Compostos Orgânicos – LISCO, Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal-RN, Brasil.

✉ renat.onca@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20180098](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180098)

Polissacarídeo Sulfatado da Esponja Marinha *Callyspongia vaginalis*

Rusceli D. de Araújo, Taíza N. da S. Caridade, Renata M. Araújo*

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto de Química, Laboratório de Isolamento e Síntese de Compostos Orgânicos – LISCO, Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal-RN, Brasil.

* renat.onca@gmail.com

Recebido em 18 de maio de 2018. Aceito para publicação em 15 de agosto de 2018

1. Introdução

2. Metodologia

- 2.1. Obtenção do polissacarídeo
- 2.2. Hidrólise do polissacarídeo
- 2.3. Infravermelho
- 2.4. Dosagem de açúcar redutor
- 2.5. Análise termogravimétrica
- 2.6. Ressonância magnética nuclear

3. Resultados e Discussão

- 3.1. Obtenção do polissacarídeo
- 3.2. Hidrólise e dosagem de açúcar redutor do polissacarídeo
- 3.3. Infravermelho
- 3.4. Análise termogravimétrica
- 3.5. Ressonância magnética nuclear

4. Conclusões

1. Introdução

Organismos marinhos representam uma fonte rica de compostos com potencial biológico promissor, destacando-se as micromoléculas, como ácidos graxos, terpenos, policetídeos e alcaloides, que atuam principalmente, como sistema químico de defesa destes seres e as macromoléculas que apresentam potencial biotecnológico promissor, como proteínas e polissacarídeos.

Dentre os organismos marinhos, destacamos as esponjas, estes animais primitivos pertencentes ao filo porífera, são possivelmente os menos desenvolvidos do reino animal, sendo os representantes multicelulares mais simples viventes.^{1,2}

Até 2010 haviam sido identificadas 8365 espécies de esponjas, e deste total, 98 % de habitat marinho¹. O interesse pelas esponjas se intensificou após estudos com a esponja *Cryptotethia crypta* e o isolamento dos compostos ARA-U e ARA-T, Uracila

arabinosídeo e Timina arabinosídeo, respectivamente. Estas moléculas conduziram à síntese de um potente anti-retroviral, o zidovudine, também conhecido como AZT.^{3,4} Desde então, as esponjas têm se tornado alvo de estudos químicos e biológicos, com inúmeras substâncias novas reportadas por ano, apresentando diversas atividades biológicas, como: antibiótica, antitumoral, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante.⁵⁻⁷

Dentre os gêneros de esponjas, podemos destacar o *Callyspongia*, o qual possui diversas classes de metabólitos já isolados, e muitos com atividade biológica comprovada. Podemos citar o policetídeo calistatina A, isolado de *C. truncata* com atividade citotóxica;⁸ os poliactilenos sifonodiol e dihidroxi-sifonodiol isolados de *C. sp* e *C. truncata*, assim como os meroterpenos ilhabreno e isoakaterpina, provenientes de *C. sp* com atividade anticâncer;^{9,10} e peptídeos como a foriospongina B, isolado de *C. bilamellata*, que possui atividade antiparasitária.¹¹ Além destas diversas outras moléculas comprovam a relevância química e biológica de estudos com espécimes pertencentes ao gênero *Callyspongia*.

As macromoléculas, como os polissacarídeos, também são identificadas e isoladas em esponjas. Quimicamente os polissacarídeos são polímeros naturais em que seus monômeros são unidades de

monossacarídeos. Estas moléculas podem ser obtidas a partir de algas marinhas, como também do camarão, caranguejo e esponjas marinhas.^{12,13} Os polissacarídeos participam de diversos processos biológicos como interação e reconhecimento celular.

Uma característica estrutural em polissacarídeos de origem marinha é a presença de grupamento sulfato,¹⁴ como as gliconectinas, que possuem a capacidade de se aderir à células, gerando uma outra classe de compostos, semelhante a proteoglicanas.¹⁵ Eles são relatados em diversas espécies de esponjas marinhas e estão associados a atividades antiviral, anti HIV, antioxidantes, antitumorais, dentre outras.¹⁶⁻¹⁸ Alguns invertebrados marinhos têm se mostrado promissores na obtenção de polissacarídeos sulfatados, com estruturas únicas como *L*-galactanas e *L*-fucanas. Estas moléculas apresentam atividades anticoagulantes e antitrombóticas devido a sua similaridade com a heparina, que é um mucopolissacarídeo sulfatado, com grande quantidade de cargas elétricas negativas e constitui o ácido macromolecular mais forte existente no organismo. Pode ser distinguida de outros polissacarídeos pela sua extrema acidez, decorrente da grande quantidade de radicais sulfatados na sua molécula,^{18,19} um mero de sua estrutura é apresentado na Figura 1 a seguir.

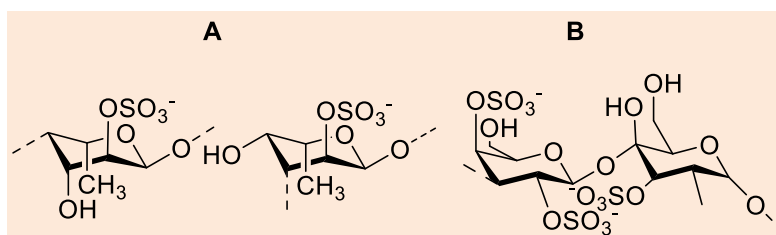


Figura 1: Estruturas de meros de α -L-fucanas sulfatadas (A); galactanas (B) sulfatadas.

Tendo em vista o grande potencial biológico que os polissacarídeos apresentam, o presente trabalho apresenta a caracterização parcial do polissacarídeo sulfatado, proveniente da esponja marinha *Callyspongia vaginalis*. Estudos com este foco não foram relatados anteriormente na

literatura para a esponja marinha em questão. Os polissacarídeos foram obtidos de modo simples e seguindo o quinto princípio da química verde, pois utiliza água como solvente extrator.^{20,21}

2. Metodologia

2.1. Obtenção do polissacarídeo

Um espécime de *Callyspongia vaginalis* (2.345 kg de peso molhado) foi coletada no Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio (situado a 10 milhas náuticas do Porto do Mucuripe A, 3°33,800 'S e 38°26,000' W; B, 3°36.000 'S e 38°26.000' W; C, 3°36.000 'S e 38°21.600' W; D, 3°33.800 'S e 38°21.600' W), a profundidades em torno de 20 m em 14 de julho de 2004, no estado do Ceará, e identificado pelo prof. Dr. Eduardo Carlos Medina Hajdu, Universidade Federal do Rio de Janeiro Janeiro, sob o número MNRJ 8671. O material animal foi seco em estufa aerada, sob 70 °C para remoção de materiais voláteis e composto fenólicos por 12 horas e em seguida triturado em liquidificador. O método de obtenção e purificação do polissacarídeo foi baseado na metodologia proposta por Soares e colaboradores com modificações.²²

2.2. Hidrólise do polissacarídeo

Pesou-se 20 mg do polissacarídeo purificado em tubo de ensaio, que foi posteriormente solubilizado com 1 mL de água destilada e mantido sob agitação constante por um período de 24 h. Em seguida adicionou-se 1 mL de HCl 4 M, sob 100 °C para início da hidrólise do mesmo.²³ A hidrólise foi acompanhada em espectrofotômetro (Uv-vis) Thermo scientific (modelo Evolution 60S), no comprimento de onda 510 nm no tempo de 2, 6 e 8 horas, para verificação de qual tempo apresentava o maior teor de monossacarídeos. O procedimento foi realizado em triplicata.

2.3. Infravermelho

A amostra de polissacarídeo foi analisada em pastilha de KBr, no espectrômetro de infravermelho na região (4000 a 400 cm⁻¹) modelo Nexus 470 FT-IR e fabricante Thermo Nicolet.

2.4. Dosagem de açúcar redutor

Para a dosagem do açúcar redutor, foi utilizado o método de Nelson Somogyi²⁴, o qual consiste na determinação de açúcares redutores solúveis. A quantidade recomendada pela técnica é de 100 mg. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão a galactose com concentrações variando de 0,8; 1; 3; 5; 7; 9 e 10 mg / mL. As medidas foram feitas em espectrofotômetro semelhante ao descrito no ponto 2.2 deste procedimento.

2.5. Análise termogravimétrica

Uma massa de aproximadamente 5,17 mg de material isolado foi aquecida em equipamento SDT-Q 600, fabricante TA, em atmosfera inerte e com taxa de aquecimento de 2,5 °C/min com uma variação de 25 °C a 900 °C.

2.6. Ressonância magnética nuclear

O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) unidimensional, foi obtido em espectrômetros Bruker, modelo Avance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). Foi utilizada sonda de detecção inversa de 5 mm, com frequência de 500,13 MHz (¹H), sob um campo magnético de 11,7 T. A amostra foi solubilizada em 0,6 mL de água deuterada (D₂O), comercializado pela Aldrich. Os deslocamentos químicos (*d*) foram expressos em partes por milhão (ppm) e

referenciado pelo pico do hidrogênio pertencente à molécula residual não-deuterada da água ($d\ 4,80$). Os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, intervalo para relaxação de 1 s e largura de pulso de 90° de 9,60 ms (0 dB). Foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento do espectro.

3. Resultados e Discussão

3.1. Obtenção e purificação do polissacarídeo

O isolamento de polissacarídeo pode ocorrer por via enzimática ou por extrações com água, seguida de precipitação com etanol. Contudo extrações enzimáticas possuem altos custos, e apesar da seletividade, o rendimento é baixo. Logo, o método adotado foi aquele no qual utiliza-se os solventes de baixo custo, água e etanol e que contemplam os princípios da química verde.^{14-16,19} Os percentuais de polissacarídeo isolado e purificado utilizando este método, foram de 2,9 % e 50 %, respectivamente. Foi obtido 30 mg do polissacarídeo purificado, denominado PoliCv, que foi submetido a hidrólise e análises por IV e RMN.

3.2. Hidrólise e dosagem de açúcar redutor do polissacarídeo

PoliCv foi submetido a reação de hidrólise por diferentes tempos para otimização do processo. Os tempos de reação utilizados

foram 2, 6 e 8 horas. A curva de galactose realizada apresentou índice de correlação $R^2=0.9925$. Para cada um destes tempos concentrações de 1,90; 4,61 e 4,50 mg/mL de material hidrolisado foram identificadas. Desse modo, conclui-se que o melhor tempo de reação é o de 6 horas, tendo em vista que em tempos maiores, a concentração dos monossacarídeos diminui, indicando assim queima ou decomposição das unidades que compõem o polissacarídeo.

3.3. Infravermelho

As análises por espectroscopia na região do infravermelho, do polissacarídeo isolado e purificado, não apresentaram mudanças significativas entre eles, e apresentou semelhanças significativas com o polissacarídeo isolado por Chen e colaboradores.²⁵ São evidenciadas bandas: 3405 cm^{-1} pertencentes a deformação axial de grupamento hidroxila; bandas em 2918 e 1415 cm^{-1} características de deformação axial e angular de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 ; sinal intenso relacionado a grupo carbonila em 1646 cm^{-1} ; pela alta intensidade da banda OH em 3405 cm^{-1} não se observa sinal de ligação N-H, contudo podemos associá-lo à uma deformação na banda de carbonila com número de onda 1543 cm^{-1} ; por fim, percebe-se, de acordo com a literatura, a presença do grupo sulfato pelo sinal discreto em 1237 cm^{-1} . As bandas apresentam-se destacadas no espectro e vale ressaltar a presença do grupo sulfato, que é o que confere a particularidade aos polissacarídeos de origem marinha, como mostrado na Figura 2.

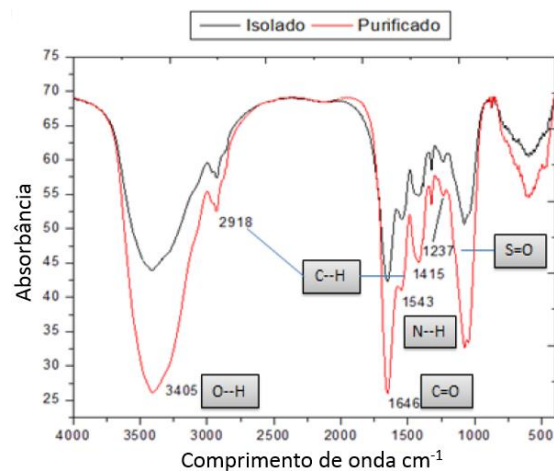


Figura 2: Espectro de infravermelho do polissacarídeo isolado e purificado.

3.4. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica é geralmente caracterizada pela temperatura na qual a decomposição do polímero se torna perceptível pela formação de produtos e cinética do processo. Um dos fatores determinantes da estabilidade térmica do polímero é a energia das ligações da cadeia principal.²⁶ Dentre as ligações, podemos

destacar a ligação C-C como umas das mais resistentes a degradação térmica. Os átomos de hidrogênio presentes na molécula aumentam a energia de estabilização da molécula, diminuindo assim a energia envolvida em sua degradação em elevadas temperaturas.²⁷ A Figura 3, a seguir, apresenta a curva de TG e DTG do polissacarídeo. Na curva DTG podemos destacar cinco regiões de degradação, conforme apresentado na Figura 3 abaixo.

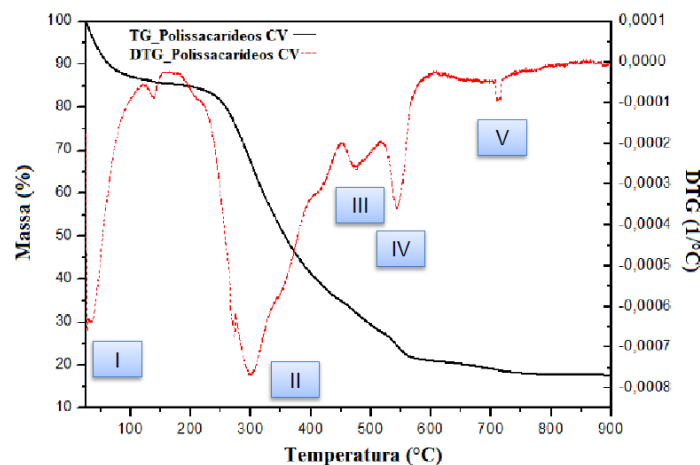


Figura 3: Curva TG e DTG para o polissacarídeo CV.

A região I, é característica de saída de água residual da amostra e corresponde a 15 % da perda de massa total da amostra. As regiões II a IV referem-se à decomposição do material orgânico com liberação de água, dióxido e

monóxido de carbono e metano, que corresponde a cerca de 70 % de degradação do material em questão. Por fim, a região V, nos fornece os dados sobre as cinzas, que são pertencentes ao material inorgânico presente

na amostra ou residual no cadinho, em nosso caso corresponde à 15 % da massa do material, indicando um percentual elevado de sais inorgânicos.

3.5. Ressonância magnética nuclear

O espectro de RMN ^1H do PoliCv apresentou sinais entre δ 3,5 e 6,0 característicos de hidrogênios ligados à carbonos metino oxigenados, e também sinais entre δ 1,5 e 3,0 que podemos atribuir a hidrogênios ligados a carbono metilênico

(diasterotópico). A comparação com dados de RMN de polissacarídeos sulfatados, descritos na literatura, confirma que a estrutura de PoliCv se assemelha a estas estruturas, principalmente com polissacarídeos da classe das carrageninas. Estes polissacarídeos naturais ocorrem com frequência em algas vermelhas, possuem estrutura dimérica, formada por unidades *D*-galactopiranoose com padrões glicosídicos $\alpha 1 \rightarrow 3$ e $\beta 1 \rightarrow 4$. Os tipos mais comuns de carrageninas são ι (lota), κ (kappa) e λ (lambda) que se distinguem entre si pelo padrão de substituição do grupo sulfato e teor 3,6 de anidrogactose,²⁸⁻³⁰ conforme apresentado na Figura 4.

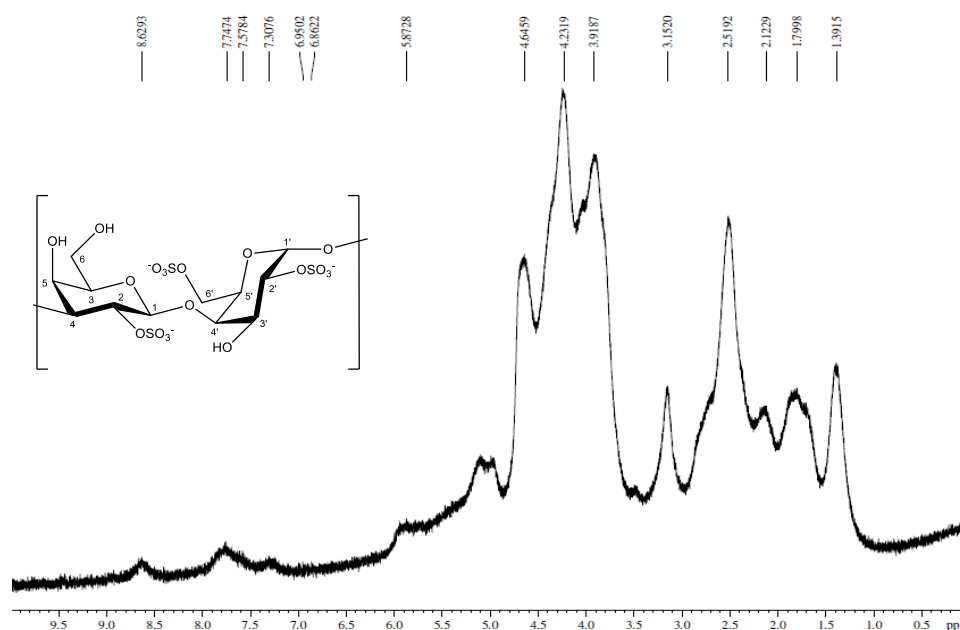


Figura 4: Espectro de RMN ^1H do PoliCv e estrutura química do mero da *D*-galactopiranoose para polissacarídeo tipo λ -carrageninas.

4. Conclusões

Com base nos dados apresentados no presente trabalho foi possível comprovar que a espécie *C. vaginalis* se apresenta como fonte de polissacarídeo sulfatado. Não existe diferença significativa entre as amostras isoladas e purificadas, e que devido ao baixo rendimento de cerca de apenas 50 % após a purificação, este pode ser utilizado já na forma isolada, sem tratamento posterior. O melhor

tempo de hidrólise foi de 6 horas, apresentando assim concentração de açúcares redutores de 4,60 mg/mL. A análise por infravermelho permitiu identificar grupos amino e sulfato na estrutura do polissacarídeo, compatível com os compostos provenientes de esponjas marinhas. Os dados de RMN confirmaram a presença de polissacarídeo sulfatado na espécie, indicando também um possível mero deste polímero. A análise térmica mostrou que o polissacarídeo apresenta estabilidade até cerca de 200 °C.

Não existe trabalho na literatura sobre isolamento de polissacarídeos de espécies do gênero *Callyspongia*, o que torna o trabalho pioneiro e promissor, considerando o potencial biológico das esponjas marinhas e dos polissacarídeos sulfatados.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento Capes e CNPq.

Referências Bibliográficas

- ¹ Esteves, A. I. S.; Nicolai, M.; Humanes, M.; Gonçalves, J. Sulfated polysaccharides in Marine Sponges: Extraction Methods and Anti-HIV Activity. *Marine Drugs* **2011**, *9*, 139. [CrossRef]
- ² Ruocco, N.; Constantini, S.; Guariniello, S.; Constantini, M. Polysaccharides from the marine environment with pharmacological, cosmeceutical and nutraceutical potential. *Molecules* **2016**, *21*, 551. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Gochfeld, D. J.; Sayed, K. A. E.; Yousaf, M.; Hu, J. F.; Bartyzel, P.; Dunbar, D. C.; Wilkins, S. P.; Zjawiony, J. K.; Schinazi, R. F.; Wirtz, S. S.; Tharnish, P. M.; Hamman, M. T. Marine natural products as lead anti-HIV agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2003**, *3*, 401. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴ Rangel, M.; Falkenberg, M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *Journal of Coastal Life Medicine* **2015**, *3*, 421. [CrossRef]
- ⁵ Taylor, M. W.; Radax, R.; Steger, D.; Wagner, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2007**, *71*, 295. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Archana, R.; Kanchana, G.; Rubalakshmi, G. Free radical scavenging and in vitro anticancer properties breast cancer cell line MCF-7 on Marine sponge *Spongia tosta*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **2015**, *4*, 723. [Link]
- ⁷ Kiem, P. V.; Huyen, L. T.; Hang, D. T.; Nguyen, X. N.; Tai, B. H.; Anh, H. L.; Tuan, C.; Pham V.; Quang, T. H.; Minh, C. V.; Nguyen, V. D. Sesquiterpene derivatives from marine sponge *Smenospongia cerebriformis* and their anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27*, 1525. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Kobayashi, M.; Higuchi, K.; Murakami, N.; Tajima, H.; Aoki, S. Callystatin A, a potent cytotoxic polyketide from the marine sponge, *Callyspongia truncate*. *Tetrahedron* **1997**, *38*, 2859. [CrossRef]
- ⁹ Umeyama, A.; Matsuoka, N.; Mine, R.; Nakata, A.; Arimoto, E.; Matsui, M.; Shoji, N.; Arihara, S.; Takei, M.; Hashimoto, T. Polyacetylene diols with antiproliferative and driving th1 polarization effects from the marine sponge *Callyspongia sp.* *Journal of Natural Medicines* **2010**, *64*, 93. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Selegim, M. H. R.; Lira, S. P.; Kossuga, M. H.; Batista, T.; Berlink, R. G. S.; Hadju, E.; Muricy, G.; Rocha, R. M.; Nascimento, G. G. F.; Silva, M.; Pimenta, E. F.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Galetti, F. C. S.; Silva, C. L.; Souza, A. O.; Peixinho, S. Antibiotic, cytotoxic an enzyme inhibitory activity of crude extracts from brazilian marine invertebrates. *Revista Brasileira de Farmacologia* **2007**, *17*, 287. [CrossRef]
- ¹¹ Capon, R. J.; Ford, J.; Lacey, E.; Gill J. H.; Heiland, K.; Friedel, T. Phoriospongina A and B: two new nematocidal depsipeptides from the australian marine sponges *Phoriospongia Sp.* and *Callyspongia Bilamellata*. *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 358. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Lee, Y. E.; Kim, H.; Seo, C.; Park, T.; Lee, K. B.; Yoo, S. Y.; Hong, S. C.; Kim, J. T.; Lee, J. Marine polisaccharide: therapeutic efficacy and biomedical applications. *Archives of Pharmacal Research* **2017**, *40*, 1006. [CrossRef] [PubMed]

- ¹³ Li, S.; Xiong, Q.; Lai, X.; Li, X.; Wan, M.; Zhang, J.; Yan, Y.; Cao, M.; Lu, L.; Guan, J. Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2016**, *15*, 237. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Bucior, I.; Burger, M. M. Carbohydrate-carbohydrate interaction as a major force initiating cell-cell recognition. *Glycoconjugate Journal* **2004**, *21*, 111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Maia, L. F.; Gonzaga, T. A.; Carvalho, R. G.; Leite, C. M.; Lobo-Hadju, G.; Aguiar, J. A. K.; Edwards, H. G. M.; Oliveira, L. F. C. Monitoring of sulfated polysaccharide content in marine sponges by raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **2016**, *87*, 149. [[CrossRef](#)]
- ¹⁶ Witvrouw, M.; Declercq, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology* **1997**, *29*, 497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Cimino, P.; Bifulco, G.; Casapullo, A.; Bruno, I.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R. Isolation and NMR characterization of rosacelose, a novel sulfated polysaccharide from the sponge *Mixylla rosacea*. *Carbohydrate Research* **2001**, *334*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Cunha, P. L. R.; Paula, R. C. M.; Feitosa, J. P. A. Possacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova* **2009**, *32*, 649. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Zierer, M. S.; Mourão, P. A. S. A wide diversity of sulfated polysaccharides are synthesized by different species of marine sponges. *Carbohydrate Research* **2000**, *328*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University press: New York, 1998.
- ²¹ Erythropel, H. C.; Zimmerman, J. B.; Winter, T. M.; Petitjean, L.; Melnikov, F.; Lam, C. H.; Lounsbury, A. W.; Mellor, K.E.; Jankovic, N. Z.; Tu, Q. The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 Principles. *Green Chemistry* **2018**, *20*, 1929. [[CrossRef](#)]
- ²² Soares, C. M.; Malagoli, B. G.; Menezes, G. B.; Pinho, V.; Souza, D. G.; Teixeira, M. M.; Braga, F. Antiadhesive activity of polysaccharide-rich fractions from *Lithothamnion muelleri*. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung* **2012**, *67*, 391. [[PubMed](#)]
- ²³ Yang, B.; Yu, G.; Zhao, X.; Jiao, G.; Ren, S.; Chai, W. Mechanism of mild acid hydrolysis of galactan polysaccharides with highly ordered disaccharide repeats leading to a complete series of exclusively odd-numbered oligosaccharides. *The FEBS Journal* **2009**, *276*, 2125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Maldoanade, I. R.; Carvalho, P. G. B.; Ferreira, N. A.; Moulin, B. S. F. Protocolo pra determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Comunicado técnico, Embrapa ISSN 1414.9850 [[Link](#)]
- ²⁵ Chen, D.; Yao, W.; Zhang, X.; Han, X.; Qu, X.; Ka, W.; Sun, D.; Wu, X. Effects of gekko sulfated polysaccharide-protein complex on human hepatoma smmc-7721 cells: inhibition of proliferation and migration. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, *127*, 702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Lim, L. Y.; Wan, L. S. C. Heat treatment of chitosan films. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1995**, *21*, 839. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Damian, C.; Beirão, L. H.; Francisco, A.; Santo, M. L. P. E.; Teixeira, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alimentos e Nutrição* **2005**, *16*, 195.
- ²⁸ Webber, V.; Carvalho, S. M.; Ogliari, P. J.; Hayashi, L.; Barreto, P. L. M. Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology. *Ciência e Tecnologia de alimentos* **2012**, *32*, 812. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Korva, H.; Karkkainen, J.; Lappalainen, K.; Lajunen, M. Spectroscopic study of natural and synthetic polysaccharide sulfate structures. *Starch* **2016**, *68*, 854. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Gonçalves, A. G.; Ducatti, D. R. B.; Paranha, R. G.; Eugenia, M.; Duarte, R.; Nosedá, M. D. Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 2123. [[CrossRef](#)] [[Pubmed](#)]