

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

Carragenana extraída da macroalga *Gigartina skottsbergii*:

uma proposta molecular de sonda para a detecção do vírus SARS-CoV-2.

Patrícia Daiane Zank

Patrícia Daiane Zank

Carragenana extraída da macroalga *Gigartina skottsbergii*:

uma proposta molecular de sonda para a detecção do vírus SARS-CoV-2.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Bioquímica e Bioprospecção do
Centro de Ciências Químicas,
Farmacêuticas e de Alimentos da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciências
(Área de Concentração: Bioquímica
e Bioprospecção)

Orientador: Rodrigo de Almeida Vaucher

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

Z31c Zank, Patricia Daiane

Carragenana extraída da macroalga *Gigartina skottsbergii* : uma proposta molecular de sonda para a detecção do vírus SARS-CoV-2. / Patricia Daiane Zank ; Rodrigo de Almeida Vaucher, orientador ; Janice Luehring Giongo, coorientadora. — Pelotas, 2023.

66 f.

Dissertação (Mestrado) — Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Macroalga. 2. Sonda. 3. Carragenana. 4. RT-LAMP. 5. qRT-PCR. I. Vaucher, Rodrigo de Almeida, orient. II. Giongo, Janice Luehring, coorient. III. Título.

CDD : 589.41

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Patrícia Daiane zank

Carragenana extraída da macroalga *Gigartina skottsbergii*:
uma proposta molecular de sonda para a detecção do vírus SARS-CoV-2.

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas.

Data de Defesa: 06/04/2023

Banca examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher (Orientador)

Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dr. Matheus Dellámea Baldissera

Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal de Santa Maria



Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho às mais de 6,6 milhões de
vítimas da pandemia.

AGRADECIMENTOS

Como mestranda, tive o privilégio de encontrar pessoas que, particularmente, contribuíram com os meus estudos e fizeram com que a área – Bioquímica e Bioprospecção – fosse agradável e fascinante. Eu gostaria de agradecer especialmente:

À Profa. Dra. Janice Luehring Giongo, minha co-orientadora por ter sido o meu primeiro contato e ter me dado a oportunidade de entrar no Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM). Sou muito grata pelo apoio.

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher, pelos valiosos ensinamentos e pelos bons exemplos de conduta ética na vida profissional. E que não mediu esforços para viabilizar a concretização do meu projeto.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) e a todos os docentes presentes durante essa jornada, pela oportunidade e apoio recebido durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço também aos membros do Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular de Micro-organismos (LaPeBBioM), por toda a ajuda no meu projeto e pelos momentos de descontração. Em especial, à Milena Cerveira por toda ajuda e paciência, a qualquer dia e horário.

Ao professor Claudio Martin Pereira de Pereira e suas alunas do Laboratório de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Laboratório de Pesquisas Lipidômicas e Bioorgânicas, Grupo de Pesquisas Bioforenses por toda ajuda na pesquisa e desenvolvimento do artigo para publicação.

Ao meu noivo Andrês Uliana Posser pela paciência, amor e constante apoio, incentivo e inspiração. Fico muito feliz por você fazer parte da minha vida.

Ao meu pai Sérgio Luiz Zank e minha mãe Irene Terezinha Zank, que apesar de não entenderem muito do que faço, estavam sempre na torcida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Sempre parece impossível até que seja feito.”

(Nelson Mandela, 1964)

Resumo

ZANK, Patrícia Daiane. **Carragenana extraída da macroalga *Gigartina skottsbergii***: uma proposta molecular de sonda para a detecção do vírus SARS-CoV-2. Orientador: Rodrigo de Almeida Vaucher. 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou como pandemia a infecção causada por SARS-CoV-2 (COVID-19), que se espalhou rapidamente pelo mundo. O COVID-19, geralmente, causa sintomas de 2 a 14 dias após a infecção. A triagem desses pacientes é considerada fundamental para o manejo da contaminação viral. Por se tratar de uma doença de transmissão rápida e sem cura, o diagnóstico precoce tem se mostrado fundamental na avaliação dos casos suspeitos, principalmente quanto aos níveis de contágio. Para isso, espécimes de *Gigartina skottsbergii* foram coletados na ecorregião subantártica chilena. A carragenana foi extraída, caracterizada e quantificada. Após incubação de 24 horas com uma suspensão viral de SARS-CoV-2 inativada, foi realizado o teste para avaliar a capacidade da carragenana de se ligar ao SARS-CoV-2. O RNA viral ligado à sonda foi então quantificado usando o método de transcrição reversa (RT-qPCR) e o método de ensaio de amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP). A partir dos resultados, foi verificado que a carragenana de algas marinhas tem um espectro semelhante à carragenana comercial, sendo que ambas alcançaram uma excelente proporção de ligação ao SARS-CoV-2 com um rendimento de 8,3%, sendo também detectado RNA viral no ensaio RT-LAMP. Este estudo mostra, pela primeira vez, a capacidade de ligação da carragenana extraída de algas subantárticas chilenas, que apresentam baixo custo e alta eficiência para ligação às partículas virais SARS-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19. Macroalga. Carragenana. Sonda. qRT-PCR. RT-LAMP.

Abstract

ZANK, Patrícia Daiane. **Carrageenan from *Gigartina skottsbergii***: a proposed molecular probe for the detection of SARS-CoV-2 virus. Advisor: Rodrigo de Almeida Vaucher. 2023. 65 p. Dissertation (Masters in Science) – Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

The World Health Organization (WHO) has declared a pandemic caused by the SARS-CoV-2 (COVID-19) infection that has spread rapidly across the world. COVID-19 usually causes symptoms 2 to 14 days after infection. The screening of these patients is considered essential for the management of viral contamination, as it is a disease with rapid transmission without cure, early diagnosis has been shown to be fundamental in the evaluation of suspected cases, especially regarding the levels of contagion. For this, specimens of *Gigartina skottsbergii* were collected in the Chilean subantarctic ecoregion. Carrageenan was extracted, characterized and quantified. After a 24-hour incubation with an inactivated SARS-CoV-2 viral suspension, the test was performed to assess the ability of carrageenan to bind to SARS-CoV-2. Viral RNA bound to the probe was then quantified using the reverse transcription method (RT-qPCR) and the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay method (RT-LAMP). From the results, it was found that seaweed carrageenan has a spectrum similar to commercial carrageenan that achieved an excellent binding ratio to SARS-CoV-2, with a yield of 8.3%, together with viral RNA was detected in the RT assay. -LAMP. This study shows, for the first time, the binding capacity of carrageenan extracted from Chilean subantarctic seaweeds, endowed with low cost and high efficiency for binding to SARS-CoV-2 viral particles.

Keywords: COVID-19. Macroalgae. Carrageenan. Probe. qRT-PCR. RT-LAMP.

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Componentes do SARS-CoV-2: Proteína Spike, Proteína de Membrana, Proteína Envelope, Proteína de Nucleocapsídeos, RNA (SAMUDRALA et al., 2020).....	17
Figura 2	Linha do tempo do surgimento das variantes do SARS-CoV-2. A classificação de acordo com a OMS é mostrada, assim como as linhagens do perfil mutagênico. Fonte: FLORES-VEGA et al. (2022).....	19
Figura 3	A estrutura das carragenanas (a) kappa – κ , (b) iota – ι e lambda – λ . Fonte: (RIOUX & TURGEON, 2015).....	25
Figura 4	Propriedades da carragenana, segundo cada tipo de carragenana.....	27
Figura 5	Efeito antiviral de polissacarídeos de algas marinhas.....	28

Manuscrito

Figure 1	The carrageenan from <i>G. skottsbergii</i> graphical extraction process.....	36
Figure 2	Location of the <i>G. skottsbergii</i> seaweed collected.....	40
Figure 3	Sample of carrageenan extracted from the red macroalgae <i>G. skottsbergii</i>	40
Figure 4	Absorption spectra of carrageenan extraction from the macroalgae <i>G. skottsbergii</i> and Sigma® κ -carrageenan (standard).....	41
Figure 5	(A) ABTS and (B) DPPH assays of <i>G. skottsbergii</i> seaweed carrageenan extraction and sigma κ -carrageenan; (*) indicate a difference and (**) indicate no statistical difference.....	42

Figure 6	Extraction from the <i>G. skottsbergii</i> macroalgae (red) and standard κ -carrageenan (black) by ATR-FTIR analysis [42].....	43
Figure 7	Chromatograms of the extracted carrageenan (a) and standard carrageenan (b).....	44
Figure 8	Evaluation of the binding capacity of SARS-CoV-2 with carrageenan extracted from <i>G. skottsbergii</i> macroalgae using RT-qPCR.....	45
Figure 9	Graphical representation for SARS-CoV-2 viral particles binding in <i>G. skottsbergii</i> macroalgae (1) and the carrageenan extract (2). Binding occurs after incubation (3). Viral RNA was isolated directly from carrageenan (4).....	46
Figure 10	Detection of SARS-CoV-2 by the RT-LAMP assay after virus binding to carrageenan. Channel 1 and 2: positive result for SARS-CoV-2 detection. Channel 3: negative control. Yellow reaction: amplification. Pink reaction: no amplification.....	46

SUMÁRIO

1 Introdução	13
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 Revisão Bibliográfica	16
3.1 Covid-19	16
3.2 Vírus SARS-CoV-2	16
3.3 Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil	18
3.3 Testes diagnóstico da COVID-19	19
3.3.1 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real por transcrição reversa (RT-q PCR)	20
3.3.2 RT-LAMP	21
3.4 Macroalgas	22
3.4.1 Gigartina skottsbergii	23
3.4.1.1 Carragenana	24
3.4.1.2 Estrutura química	24
3.4.1.3 Propriedades e aplicações das carragenanas	26
3.4.1.4 Atividade antiviral	27
3.4.1.5 Carragenana com capacidade de ligação	28
4 Manuscrito	30
5 Conclusão	54
Referências	56
Anexos	64

1 Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou uma pandemia causada pela infecção por SARS-CoV-2 (COVID-19) em decorrência da ampla disseminação de casos de Covid-19, causando efeitos epidemiológicos, sociais, econômicos, consequências culturais e políticas (SCHOELER et al., 2022). O COVID-19 ainda está tendo um impacto devastador, de acordo com o último relatório da OMS. Naquela época, a doença registrava mais de 640 milhões de casos e 6,6 milhões de mortes em todo o mundo (WHO, 2023a). Só no Brasil, foram mais de 37 milhões de casos e 699 mil mortes em decorrência da Covid-19 (BRASIL, 2023).

O COVID-19 geralmente causa sintomas de 2 a 14 dias após a infecção. Alguns estudos apontam casos que a carga viral pode ser encontrada em pacientes após 40 dias depois do início dos sintomas (MOREIRA, 2021). A triagem desses pacientes é considerada fundamental para o manejo da contaminação viral. Por se tratar de uma doença de transmissão rápida e sem cura, a forma mais eficaz de conter sua disseminação é a detecção para isolar os pacientes (POKHREL; HU; MAO, 2020). Diagnósticos eficazes que possam detectar a COVID-19 de forma rápida e barata são necessários com urgência, já que esse diagnóstico precoce tem se mostrado fundamental na avaliação dos casos suspeitos, principalmente quanto aos níveis de contágio (XI et al., 2021).

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) tem funcionado como o teste padrão global para identificação viral desde o início da pandemia de COVID-19. Este teste mostra-se mais eficiente do que o teste sorológico, por identificar casos positivos na fase inicial da doença, ainda durante o período de incubação ou sem a presença dos sintomas. De maneira que, esta técnica tem sido extremamente utilizada no diagnóstico clínico e vigilância de pacientes suspeitos. No entanto, métodos alternativos para identificar o SARS-CoV-2 têm sido propostos (TRASSANTE et al., 2021). Nos últimos dois anos, foram realizados estudos com o objetivo de desenvolver novas estratégias moleculares para a detecção do SARS-CoV-2. Recentemente, um novo ensaio quantitativo de fluxo lateral molecular para SARS-CoV-2, na forma de uma tira de teste foi desenvolvido com base em um ensaio de fluxo lateral de ácido nucleico de nanopartículas de ouro. O método de fita molecular sugerido é simples e barato, com análise rápida e quantificação

simultânea, além de oferecer alta detecção e especificidade (MAGLARAS et al., 2022).

A carragenana é rica em polissacarídeos sulfatados específicos que têm um efeito significativo atribuído à sua forte capacidade de interferir na ligação inicial do vírus às células-alvo e tecidos do hospedeiro (MANDAL et al., 2020). Kwon et al. (2020) em um estudo demonstrou que a carragenana se liga fortemente à proteína S do SARS-CoV-2 in vitro, o que sugere que eles podem atuar como iscas para interferir na ligação da proteína S ao co-receptor de sulfato em tecidos do hospedeiro, inibindo a infecção viral.

A carragenana é uma substância coloidal hidrofílica obtida da extração aquosa ou alcalina de alguns membros das Rhodophyceae (algas vermelhas) (ARIEDE et al., 2017). A alga *Gigartina skottsbergii*, encontrada na Argentina, Chile e ao longo da Península Antártica, é uma importante fonte natural de carragenana (BERNEIRA et al., 2021; D'ARCHINO; NELSON; SUTHERLAND, 2020). Esta macroalga vermelha pertence ao filo Rhodophyta e contém carragenana. É uma das algas marinhas mais exploradas no Chile devido ao seu alto teor de carragenana, que pode representar mais de 70% de seu peso seco (WESTERMEIER et al., 2022). O objetivo deste estudo foi extrair e caracterizar a carragenana da macroalga chilena *G. skottsbergii* para uso em métodos moleculares como uma sonda de ligação para o vírus SARSCoV-2. O estudo revelou, pela primeira vez, que as macroalgas em análise têm potencial para futuras aplicações na detecção do SARS-CoV-2.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Extrair e caracterizar a carragenana da macroalga chilena *G. skottsbergii* para uso em métodos moleculares como uma sonda de ligação para o vírus SARSCoV-2.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair a carragenana da macroalga de *G. skottsbergii* coletada na ecorregião subantártica chilena;
- Caracterizar por espectroscopia de varredura UV-Vis a carragenana extraída da macroalga *G. skottsbergii*, e caracterizar também a carragenina comercial (SIGMA®);
- Determinar a atividade antioxidante do extrato de macroalgas *G. skottsbergii* e da carragenana comercial;
- Verificar através de espectroscopia de reflectância total atenuada (ATR-FTIR) os espectros de carragenana comercial e da macroalga *G. skottsbergii*;
- Analisar o perfil cromatográfico e tempo de retenção através de cromatografia Líquidos de ultra alta eficiência (UHPLC-UV-Vis) da macroalga *G. skottsbergii* e da carragenana comercial;
- Avaliar o potencial da carragenana para remover o SARS-CoV-2;
- Verificar a capacidade de ligação do SARS-CoV-2 com carragenana extraída da macroalga *G. skottsbergii* usando RT-qPCR;
- Detectar RT-LAMP como método alternativo a capacidade de ligação do SARS-CoV-2 com carragenana extraída da macroalga *G. skottsbergii*.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Covid-19

Em três de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) decretou pandemia em decorrência da ampla disseminação de casos de Covid-19. Desde então, mais de 759 milhões de infectados e 6,9 milhões de mortes pelo mundo até o momento (março de 2023), e os casos continuam em ascensão (WHO, 2023). Só no Brasil, são mais de 37 milhões de casos e 699 mil mortes em decorrência da Covid-19 (BRASIL, 2023).

O contato direto com aerossóis, gotículas e superfícies contaminadas foi estabelecido como a principal via de transmissão. Sintomas mais frequentes em decorrência da doença causada pelo SARS-CoV-2 incluem sintomas leves a muito graves. Sintomas leves normalmente não requerem atendimento médico, apenas isolamento e monitoramento dos sintomas. Incluem-se nessa lista, especialmente, a febre e tosse leve. Os sintomas graves necessitam de atendimento médico imediato e incluem, dentre outros, a dificuldade de respirar ou dor/pressão no peito (FREITAS; NAPIMOGA; DONALISIO, 2020; GUAN et al., 2020). Com o decorrer do avanço de casos, novos sintomas foram sendo descritos: fadiga, dores musculares, dor de cabeça, perda de paladar e/ou olfato, dor de garganta, congestão nasal, náuseas, vômito, diarreia etc. (CCDC, 2020).

A capacidade de transmissão está diretamente ligada à carga viral no fluido do transmissor, que pode apresentar o pico de um a dois dias antes do início dos sintomas e vai diminuindo com o passar do tempo. Alguns estudos apontam casos que a carga viral pode ser encontrada em pacientes após 40 dias depois do início dos sintomas. A identificação precoce de casos suspeitos representa uma imprescindível janela de oportunidade para o melhor manejo da pandemia (MOREIRA, 2021).

3.2 Vírus SARS-CoV-2

Os coronavírus (CoV) são um grupo de vírus de genoma de ácido ribonucleico (RNA) simples de sentido positivo. Pertencentes a subfamília Orthocoronavirinae da família Coronaviridae (ordem Nidovirales) classificam-se em quatro gênero de CoV: Alfacoronavírus (AlphaCoV), Betacoronavírus (BetaCoV), Deltacoronavírus (DeltaCoV) e Gamacoronavírus (GamaCoV), o qual o gênero BetaCoV é dividido em cinco

subgêneros ou linhagens (YU et al., 2020), causando doenças respiratórias, gastrointestinais, hepáticas e neurológicas, sendo inicialmente observados em aves domésticas na década de 1930 (ZHOU et al., 2020).

O SARS-CoV-2, também denominado de novo coronavírus, pertence ao gênero BetaCoV, um vírus de RNA, formado por uma única cadeia, composto por proteínas não estruturais e proteínas estruturais, incluindo proteína de pico (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeos (N) e proteínas acessórias (ALIPOOR et al., 2021; BORGES, 2020; MOHAMADIAN et al., 2021). A proteína de pico S é a maior do grupo e apresenta papel importante na infectividade da covid-19; a proteína M é a mais abundante e fornece suporte estrutural. A proteína S tem como receptora a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). A ACE2 é responsável pela vasodilatação e regula o sistema renina-angiotensina. A ACE2 tem papel fundamental na infecção do SARS-CoV-2 (PILLAY, 2020). Ao entrar na célula, o SARS-CoV-2 acopla-se com o domínio de ligação receptor (RBD) de sua proteína de pico (proteína S) no receptor ACE2 das células receptoras (HEMMER; LÖBERMANN; REISINGER, 2021). Normalmente podem desenvolver mutações ao longo do tempo, resultando em variantes que podem possuir características distintas de suas cepas ancestrais. Com o sequenciamento genômico periódico, no decorrer de 2020 a 2022, foi possível detectar novas variantes genéticas (ALEEM A; AKBAR SAMAD AB; VAQAR S, 2023).

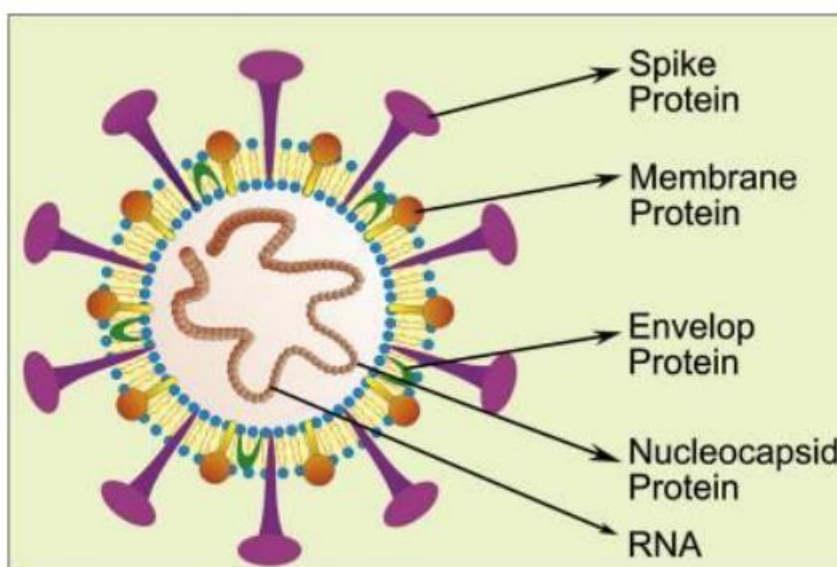


Figura 1: Componentes do SARS-CoV-2: Proteína Spike, Proteína de Membrana, Proteína Envelope, Proteína de Nucleocapsídeos, RNA (SAMUDRALA et al., 2020).

A taxa de mutação é maior em um vírus de RNA de uma cadeia, como é o caso do SARS-CoV-2. Dessa forma, os coronavírus sofrem mutação rapidamente, principalmente na proteína de pico S, o que faz com que o vírus fuja da resposta imune. As alterações nessas proteínas podem gerar muitas variantes com diferentes características de virulência distintas (ÖZKAN OKTAY et al., 2021).

3.3 Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil

Desde o início da pandemia de COVID-19, análises genéticas do SARS-CoV-2 vêm sendo realizadas em diferentes momentos e em vários locais do mundo, e revelam que o vírus sofreu diversas mutações. As mutações são eventos naturais da replicação viral, sendo muito mais frequentes em vírus de genoma RNA. A maior parte das mutações não fornece qualquer vantagem ou desvantagem para o vírus. Entretanto, um pequeno número de mutações pode conferir novas propriedades químicas às proteínas virais, resultando em mudanças na forma como o vírus se comporta nas infecções.

Os eventos de mutagênese, particularmente na subunidade S1 da proteína da proteína S, podem aumentar sua patogenicidade, infectividade e disseminação. As variantes virais aumentam a eficiência da transmissão viral, o tropismo celular e a patogenicidade, e escapam do reconhecimento imunológico. A alta taxa de mutação torna necessária uma classificação do genoma viral em linhagens, grupos ou clados. A OMS propõe uma classificação viral através da utilização do alfabeto grego:

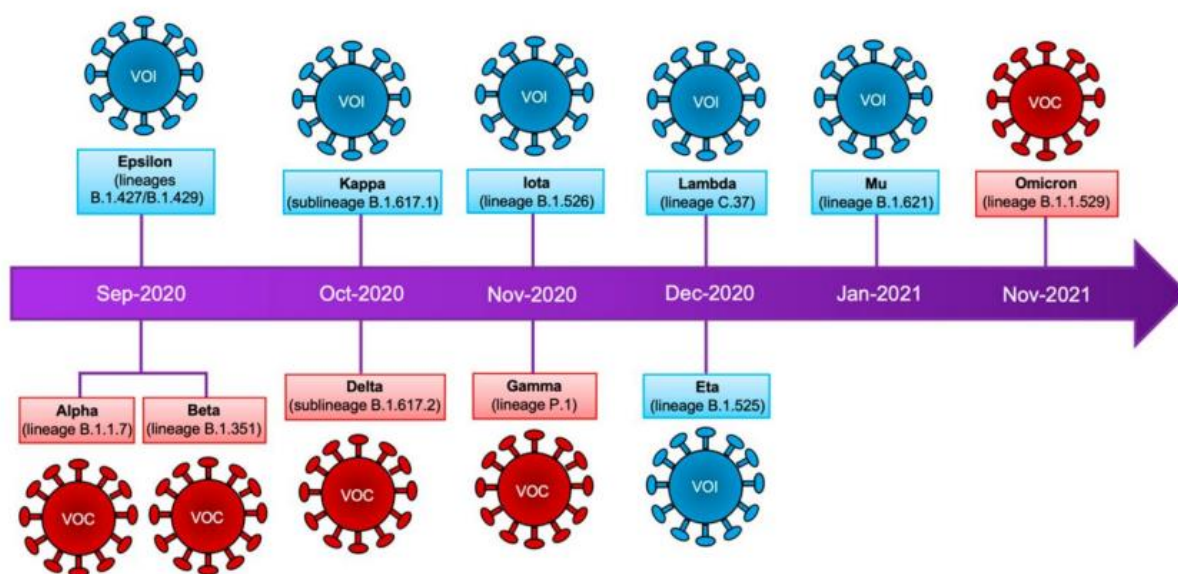


Figura 2: Linha do tempo do surgimento das variantes do SARS-CoV-2. A classificação de acordo com a OMS é mostrada, assim como as linhagens do perfil mutagênico. Fonte: FLORES-VEGA et al. (2022).

As variantes foram classificadas pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC-US) e a OMS em classes de acordo com: variantes de preocupação (COV) e variantes de interesse (VOI). De maneira que Alfa, Beta, Gama, Delta e Omicron são definidos como COVs, e as variantes Lambda e Mu são classificadas como VOIs. (CANDIDO et al., 2022). Os COVs são apontados com maior transmissibilidade, virulência, gravidade nos sintomas da doença, diminuição da eficiência dos anticorpos e redução da eficácia dos tratamentos e proteção induzidos pelas vacinas disponíveis (FLORES-VEGA et al., 2022).

A vigilância epidemiológica torna-se fundamental, visto que, é uma estratégia para determinar o surgimento de novas variantes virais e identificar sua disseminação e taxa de letalidade através de testes laboratoriais. O desenvolvimento de novas técnicas pode ajudar a diminuir o surgimento de novas variantes virais e, assim, reduzir a mortalidade e a morbidade causadas pela infecção por SARS-CoV-2.

3.3 Testes diagnóstico da COVID-19

É imprescindível que o diagnóstico precoce seja rápido para rastrear os indivíduos infectados, identificar de onde vem a transmissão inicial e conseguir

controlar a disseminação de SARS-CoV-2 da forma mais rápida possível. A confirmação atual da infecção por COVID-19 pode ser obtida por meio de sintomas clínicos, achados de imagem, mas se torna indispensável a confirmação através de testes laboratoriais. Isso ocorre pela dificuldade devido às semelhantes “queixas” provocadas por outros patógenos respiratórios, incluindo os vírus influenza e parainfluenza (SILVA et al., 2020).

De forma que os testes utilizados são avaliações de biomarcadores, testes de ácido nucleico e métodos sorológicos, ou seja, testes diretos são usados para detectar a presença de partículas virais, antígenos de vírus ou RNA viral, enquanto testes indiretos são usados para detectar a resposta imunológica contra SARS-CoV-2 em pacientes com COVID-19, particularmente, para detectar anticorpos IgM e IgG produzidos como resposta do sistema imunológico do indivíduo à infecção pelo vírus e não são recomendados para diagnóstico de novos casos (SILVA et al., 2020; NETO; FREIRE, 2020).

As técnicas moleculares são mais adequadas que os testes clínicos para diagnósticos precisos, pois podem direcionar e identificar patógenos específicos. O desenvolvimento de técnicas moleculares depende do entendimento, da composição proteômica e genômica do patógeno ou da indução de alterações na expressão de proteínas ou genes no hospedeiro durante e após a infecção (UDUGAMA et al., 2020).

3.3.1 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real por transcrição reversa (RT-q PCR)

A técnica de transcrição reversa seguida pela PCR em tempo real (RT-q PCR) é considerada o teste padrão ouro para identificação da COVID-19 pela sua sensibilidade, especificidade e velocidade. O RT-q PCR mostra-se mais eficiente do que o teste sorológico, por identificar casos positivos na fase inicial da doença, ainda durante o período de incubação ou sem a presença dos sintomas. Essa técnica está baseada na identificação do RNA viral (SILVA et al., 2020; GREEN et al., 2020).

A detecção do aumento do produto de qPCR ao longo de cada ciclo é possível em virtude de utilizar reagentes fluorescentes que possibilitam a detecção da formação do produto da PCR. Esses reagentes podem ser de dois tipos: uma sonda específica que reconhece sequências do genoma (TaqMan); ou um corante fluorescente que apresenta alta afinidade ao DNA dupla-fita, ligando-se a qualquer

sequência amplificada (SYBR Green). Essa ligação reagente-amplicon faz com que aumente a fluorescência e permite detectar o produto da qPCR conforme este se acumula durante os ciclos da reação (HOLLAND et al., 1991; HUGGETT et al., 2005).

Ou seja, a transcrição reversa consiste na síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA) utilizando como molde um RNA, por meio da ação da enzima transcriptase reversa; A RT-PCR envolve a realização de duas fases: na primeira ocorre a transcrição reversa do RNA (formação das primeiras fitas) e na segunda, a amplificação das moléculas de cDNA obtidos após a transcrição reversa (primeira fase) (GREEN et al., 2020).

3.3.2 RT-LAMP

O teste RT-qPCR é considerado o padrão para a detecção de SARS-CoV-2. No entanto, o RT-qPCR requer equipamentos complexos, treinamento extensivo para profissionais e várias horas para concluir o procedimento. Com a pandemia, essas limitações são ainda mais acentuadas, uma vez que o RT-qPCR é um teste demorado e de elevado custo. O outro ensaio amplamente utilizado é o teste de sorologia Covid-19, que detecta anticorpos ou antígenos associados à infecção pelo vírus. Esses testes são fáceis e rápidos, bem como de baixo custo, mas os imunoensaios de sorologia não têm a precisão confiável do SARS-CoV-2 devido à sua baixa sensibilidade e altas taxas de falsos negativos/positivos. Novas soluções para a detecção de Covid-19 estão em alta demanda, e um método parece ser a resposta, a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). Assim, o RT-LAMP ocupa um meio termo entre o RT-qPCR e os testes rápidos de antígeno. A simplicidade se aproxima dos testes rápidos de antígeno, tornando-o adequado para uso no local de atendimento, mas a sensibilidade se aproxima a do RT-qPCR (CHOI; MOEHLING; MEAGHER, 2023).

A LAMP é uma tecnologia que fornece amplificação de ácido nucleico em um curto espaço de tempo, usando de 4 a 6 primers especialmente projetados e uma DNA polimerase com atividade de deslocamento em cadeia. A versão especializada da DNA polimerase com atividade de deslocamento de fita ignora a necessidade de desnaturação do DNA pelo calor. Como o método LAMP só precisa de uma temperatura constante (geralmente 65 °C), o dispositivo de desempenho pode ser mais simples e, portanto, mais barato e menor do que um termociclador. Se o molde

for RNA, a reação de amplificação pode ser realizada em uma etapa pela adição de uma transcriptase reversa, e é, portanto, chamada de lâmpada de transcrição reversa (RT-LAMP) (MAUTNER et al., 2020; NOTOMI et al., 2000).

Este novo processo é semelhante aos testes convencionais de PCR, com a exceção de que a amplificação do ácido nucleico ocorre a uma dada temperatura, de modo que certos equipamentos obrigatórios para PCR, como um termociclador, não são mais necessários. Outras vantagens do método RT-LAMP incluem amplas faixas de pH e temperatura que são aceitáveis, a capacidade do ensaio de aceitar amostras não processadas e a flexibilidade dos métodos de leitura, ao mesmo tempo em que mantêm a especificidade e a sensibilidade aproximadamente iguais aos dos testes de PCR (CHOI; MOEHLING; MEAGHER, 2023).

Estudos que comparam RT-LAMP com RT-qPCR com amostras pareadas tendem a descobrir que RT-LAMP detecta vírus de forma confiável em amostras que se amplificam por RT-qPCR em um ciclo de quantificação (Cq) <30. RT-LAMP torna-se menos confiável para amostras com valores de Cq na faixa de 32–35 (DAO THI et al., 2020).

O estudo Trassante et al. 2021 é o primeiro a relatar o uso do método RT-LAMP com as amostras de saliva de profissionais de saúde, amostras de saliva positivas foram confirmadas por RT-LAMP e RT-qPCR que os resultados eram positivos, enquanto um caso negativo foi confirmado como negativo por qRT-PCR, , mostrando que o RT-LAMP é um método rápido, de baixo custo e seguro para o rastreamento do SARS-CoV-2 em profissionais de saúde. Barboza et al., 2023 descreve que foi possível detectar SARS-CoV-2 em 96,7% dos profissionais de saúde testados usando os primers do gene E, enquanto no gene N aproximadamente 100%. Assim o RT-LAMP, é validado mais uma vez como um método simples, sensível e seguro e mostrou alta sensibilidade e especificidade quando comparado a um RT-qPCR amplamente utilizado.

3.4 Macroalgas

Os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície terrestre e podem conter até 90% dos organismos do planeta. A biodiversidade global que o ambiente marinho representa é a maior fonte de compostos bioativos com notáveis potenciais,

considerado assim, ambiente com diversidades de produtos que podem ser uma fonte rica de substâncias para fins cosméticos e farmacológicos (MACIEL et al., 2018).

As algas são organismos fotossintéticos que integram um grupo diversificado do ambiente marinho, as quais podem ser classificadas em microalgas e macroalgas. As microalgas são espécies unicelulares e multicelulares simples, que podem ser encontradas em todos os ecossistemas e em áreas de água oceânica como fitoplâncton. Já as macroalgas geralmente são encontradas nas áreas costeiras e são divididas em três classes principais: algas vermelhas (Rhodophyceae), algas marrons (Phaeophyceae) e as algas verdes (Chlorophyceae) (ARIEDE et al., 2017).

O ambiente aquático é um ambiente hostil. Organismos marinhos como algas, precisam se adaptar a uma maneira de sobreviver a variadas condições ambientais presentes nos oceanos. Assim, os organismos marinhos são forçados a desenvolver uma resposta às condições físicas e químicas extremas no ambiente marinho, contribuindo para a produção de diversos compostos químicos (AGRAWAL et al., 2018).

Em condições normais de crescimento, ou seja, reprodução, as macroalgas produzem tanto metabólitos primários, que estão diretamente envolvidos nas funções fisiológicas, como também metabólitos secundários, que são produzidos em diferentes condições de estresse, como exposição à radiação ultravioleta, mudanças de temperatura, salinidade ou poluentes ambientais. Os metabólitos primários de algas incluem proteínas, aminoácidos, polissacáridos e ácidos graxos. Já os metabólitos secundários produzidos nos tecidos das algas são compostos por fitoesteróis, polifenóis, pigmentos, esteróis, vitaminas e outros compostos bioativos (PEREIRA, 2018).

Existem cerca de dez mil espécies de algas identificadas no mundo. Considerando sua grande diversidade taxonômica, apenas algumas representantes foram quimicamente estudadas e caracterizadas para rastrear moléculas com aplicações potenciais (RODRIGUES et al., 2015). Nesse sentido, pesquisas sobre identificação de compostos biologicamente ativos revelam-se propícias nesse recurso inexplorado.

3.4.1 *Gigartina skottsbergii*

Gigartina skottsbergii é uma grande espécie de Gigartinacea pertencente às algas vermelhas, distribuída na Argentina, Chile, e ao longo da Península Antártica (HUGHEY et al., 2020). Integram o filo *Rhodophyta*, normalmente quase todas as algas multicelulares, marinhas e fixadas na matriz, tendo como principal característica a presença do pigmento ficoeritrina em suas células, responsável pela coloração do rosa claro ao vermelho escuro (PEREIRA et al., 2009; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Além disso é rica em carragenana, que são polissacarídeos extraídos de algas vermelhas (PEREIRA, 2018).

Gigartina skottsbergii é uma das principais fontes de matéria-prima para a indústria de carragenana no Chile (BUSCHMANN et al., 2001). As extrações a partir da *Gigartina skottsbergii* representam materiais com impacto mínimo no meio ambiente e têm grande potencial de aplicação no processamento de alimentos, medicina, engenharia elétrica e grandes indústrias farmacêuticas (ŠIMKOVIC et al., 2021).

3.4.1.1 Carragenana

A palavra carragenana se originou de uma pequena aldeia, Carragheen, na costa irlandesa, onde cresce a alga *Chondrus crispus*, ou “musgo irlandês”, portadora de carragenana. Ela tem sido usada na Irlanda desde 400 D.C. como gelatina e como remédio caseiro para curar tosses e resfriados (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013). As principais algas utilizadas para a produção de carragenana são *C. crispus*, *C. ocellatus*, *Gigartina stellata*, *G. radula*, *G. acicularis*, *G. skottsbergii*, *Eucheuma cottonii*, *E. spinosum*, *Furcellaria fastigata* e *Hypnea musciformis*. (PANGESTUTI; SIAHAAN; KIM, 2018). A biossíntese da carragenina depende de dois fatores, que podem ser divididos em exógenos, determinados pelas condições de cultivo das algas (luz, temperatura e salinidade) e as endógenas, relacionadas com a fisiologia das algas, ou seja, estágio de desenvolvimento na hora da colheita (YERMAK et al., 2012).

As carragenanas são extraídas de algas vermelhas, da espécie Gigartinales especialmente da família das Rodofíceas, com composição rica em polissacarídeos hidrofílicos. Carragenana é o nome geral para um grupo de compostos sulfatados de alto peso molecular (ZIA et al., 2017).

3.4.1.2 Estrutura química

A carragenana é um poligalactano sulfatado com 15 a 40% de conteúdo de éster-sulfato e uma massa molecular relativa média bem acima de 100 kDa. É formado por unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-galactose (3,6-AG) unidas por ligações α -1,3 β -1,4 glicosídicas (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013). Existem diferentes tipos de carragenana, que podem ser classificadas como λ (lambda), κ (kappa) e ι (iota), μ (mu)-, ν (nu) e θ (theta), formas de acordo com o número de grupos sulfatos da unidade de galactose, onde o número, a localização química e o arranjo desses grupos definem a função e a propriedade da carragenana (ÁLVAREZ-VIÑAS et al., 2021; SHI et al., 2017).

As carragenanas κ , λ , ι (Figura 1) são os tipos mais relevantes industrialmente, por possuírem atividades antivirais, antibacterianas, fotoprotetoras, antioxidante, anti-inflamatórios (SHI et al., 2017; SUSANO et al., 2021). A carragenana kappa tem excelente capacidade de formação de géis e filmes com melhores propriedades mais fortes e rígidas, tem a presença de íons de potássio, tem um teor de sulfato de éster de cerca de 25 a 30% e um teor de 3,6-AG de cerca de 28 a 35%, sendo amplamente utilizada como agente espessante, emulsificante e gelificante na indústria de alimentos. Na área farmacêutica, existem estudos direcionados para a utilização do polímero (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013; SAHOO et al., 2017). Enquanto a carragenana iota forma géis macios, claros e elásticos na presença de íons de cálcio, tem um teor de sulfato de éster de cerca de 28 a 30% e um teor de 3,6-AG de cerca de 25 a 30% (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013; PANGESTUTI; SIAHAAN; KIM, 2018). Já a carragenana lambda não forma gel, é um poligalactano sulfatado, tem um teor de sulfato de éster de cerca de 32 a 39% e nenhum teor de 3,6-AG, e é normalmente utilizada como aditivo alimentar (IWASAKI; WATARAI, 2020; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

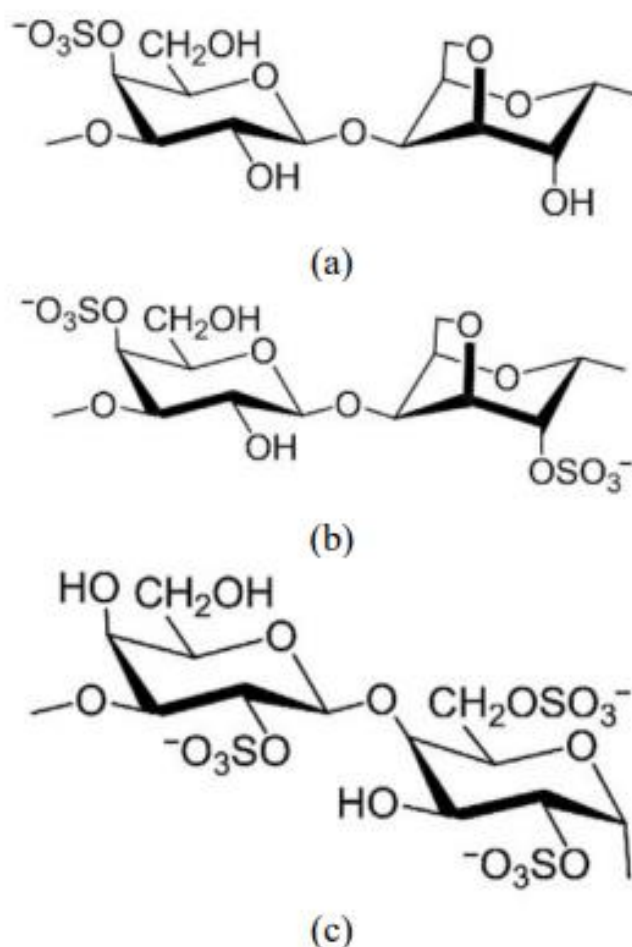


Figura 3: A estrutura das carragenanas (a) kappa – κ , (b) iota – ι e lambda – λ . Fonte: RIOUX & TURGEON (2015).

3.4.1.3 Propriedades e aplicações das carragenanas

A atividade da carragenana é devido, principalmente, aos seus grupos sulfato semi-éster que são fortemente aniônicos. O ácido livre é instável e as carragenanas comerciais estão disponíveis como sais estáveis de sódio, potássio e cálcio ou, mais comumente, como uma mistura destes. Os cátions associados juntamente com a conformação das unidades de açúcar na cadeia polimérica determinam as propriedades físicas das carragenanas (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

A funcionalidade tem várias aplicações e depende, em grande parte, de suas propriedades. As carragenanas, como polímeros lineares solúveis em água, normalmente formam soluções aquosas altamente viscosas. Isto é devido à sua estrutura macromolecular linear não ramificada e natureza polieletrólítica. A repulsão mútua dos muitos grupos de sulfato de meio éster carregados negativamente ao longo

da cadeia polimérica faz com que a molécula seja altamente estendida, enquanto sua natureza hidrofílica faz com que ela seja cercada por uma bainha de moléculas de água imobilizadas. Ambos os fatores contribuem para a resistência ao fluxo (ZIA et al., 2017).

As carragenanas têm demonstrado potenciais qualidades bioativas, incluindo propriedades antivirais, antibacterianas, anti-hiperlipidêmicas, anticoagulantes, antioxidantes, antitumorais e imunomoduladoras. A Figura 4 mostra um resumo dessas propriedades e dos tipos de carragenana que as exibem.

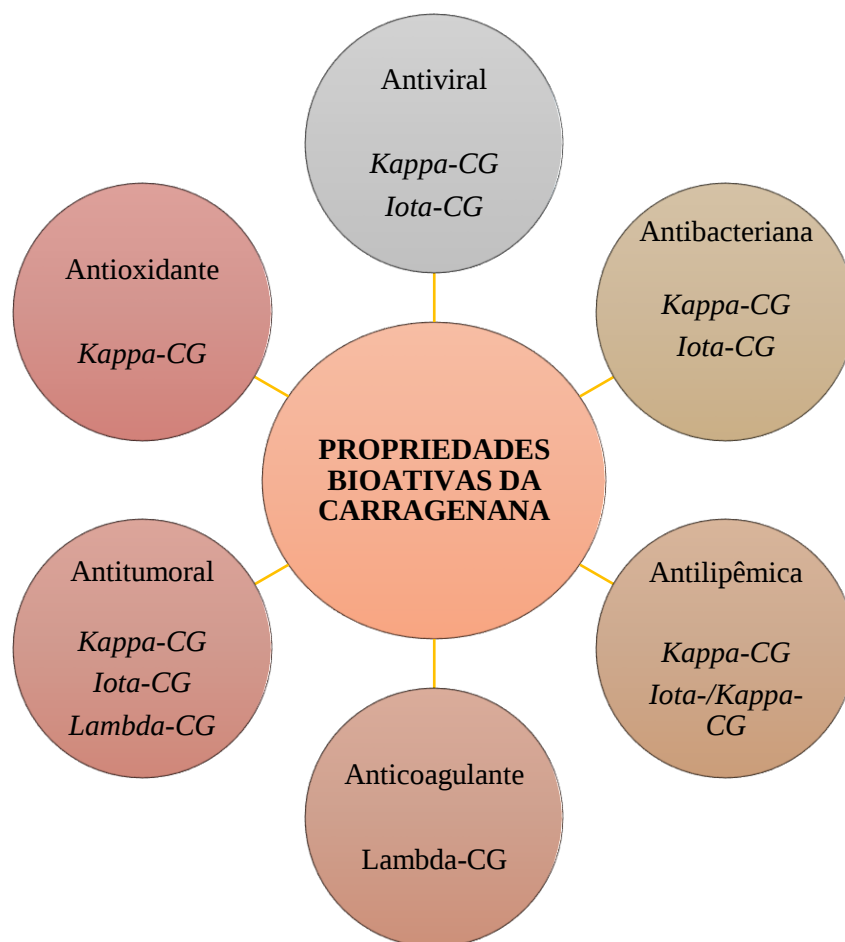


Figura 4: Propriedades da carragenana, segundo cada tipo de carragenana.

3.4.1.4 Atividade Antiviral

Os vírus podem ser divididos em duas categorias principais: vírus envelopados, que têm uma membrana lipídica (envelope) que é derivada da célula hospedeira, e vírus não envelopados, que não possuem uma membrana. A presença e ou ausência do envelope pode condicionar a sua susceptibilidade a diferentes desinfetantes ou agentes antivirais (WIGGINTON; KOHN, 2012).

Evidências demonstraram que moléculas com cargas negativas, como grupos sulfato das carragenanas, podem neutralizar cargas positivas na superfície das células hospedeiras, de modo a impedir a absorção, penetração e processo de remoção do revestimento dos vírus (JIANG et al., 2021). Sendo as carragenanas relatadas como eficazes, principalmente contra vírus envelopados. Os mais estudados são membros da família *Herpesviridae* que compreende o vírus herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 e 2) (BOULHO et al., 2017; CÁCERES et al., 2000; CARLUCCI et al., 1997a; GOMAA; ELSHOUBAKY, 2015), vírus varicela zoster (VZV) e dengue (F-TISCHER et al., 2006). Outros vírus envelopados afetados por carragenanas incluíram o vírus da dengue tipo 2 (DENV-2) (F-TISCHER et al., 2006), o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BABA et al., 1988; YAMADA et al., 2000), entre vários outros estudos demonstrando a ação antiviral da carragenana. Além disso, estudos recentes demonstraram que as carragenanas iota e lambda têm uma potente atividade inibitória contra o SARS-CoV2 (JANG et al., 2021; PEREIRA; CRITCHLEY, 2020).

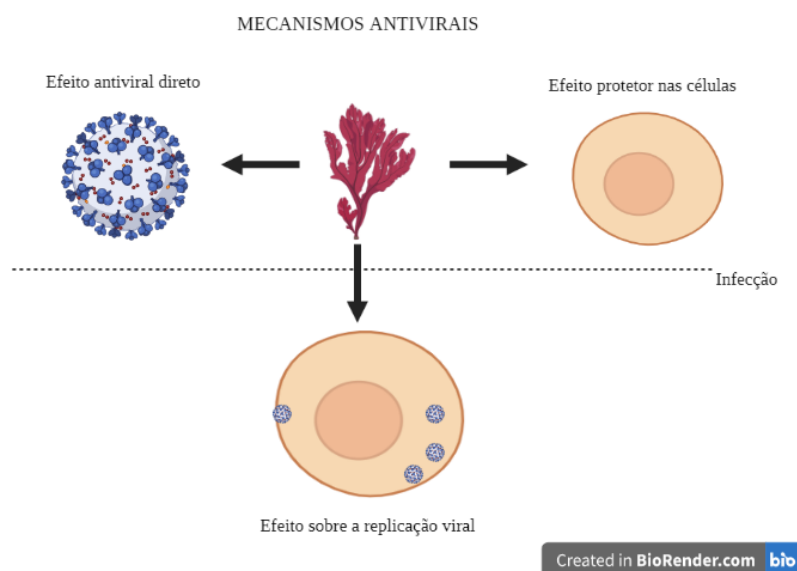


Figura 5: Efeito antiviral de polissacarídeos de algas marinhas.

Os mecanismos antivirais incluem um efeito virucida direto, um efeito sobre a replicação viral e/ou um efeito preventivo sobre as células suscetíveis, ou seja, a atividade antiviral da carragenana se deve à sua capacidade de se ligar às

glicoproteínas do envelope viral e impedir a ligação do vírus aos receptores da superfície celular (CARLUCCI et al., 1997).

3.4.1.5 Carragenana com capacidade de ligação

A carragenana é conhecida por formar soluções poliméricas aquosas gelificantes, podendo formar um hidrogel em temperaturas mais baixas e gradualmente "derrete" em uma solução viscosa com o aumento da temperatura. Uma vez que as moléculas carregam uma carga devido à presença dos grupos sulfato, os contra-íons desempenham um papel vital no processo de gelificação. Sua presença reduz a repulsão entre as hélices, portanto, uma rede mais densa e, conseqüentemente, um gel muito mais forte é formado (CERAR, 2015).

O comportamento de consolidação tem capacidade de ligação com outros polímeros e alta capacidade de absorção de água, atualmente as carragenanas estão beneficiando as indústrias farmacêuticas para projetar sistemas de administração de medicamentos com pH e sensibilidade à temperatura, perfil de liberação prolongada do medicamento (provavelmente para horas ou dias), aumento da dissolução e biodisponibilidade de drogas pouco solúveis em água. (CERAR, 2015). Lobregas et al. (2019) mostra o desenvolvimento de um protocolo sintético simples que implementa o biopolímero carragenana como agente redutor e estabilizador de nanopartículas de prata, resultando na formação de uma sonda seletiva de ligação para detecção colorimétrica de Hg^{2+} .

4 Manuscrito

A metodologia e os resultados obtidos nesta dissertação serão apresentados na forma de manuscrito e representam, na íntegra, o estudo. O presente manuscrito está formatado de acordo com as normas da revista a qual foi submetido e aceito para publicação na revista *Biosensors*, **Fator de Impacto:** 5.743 (2021); Fator de impacto de 5 anos: 5.972 (2021).

Doi: **<https://doi.org/10.3390/bios13030378>**

Carrageenan from *Gigartina skottsbergii*: a proposed molecular probe for the detection of SARS-CoV-2 virus.

Patrícia Daiane Zank¹, Milena Mattes Cerveira¹, Victor Barboza dos Santos¹, Vitor Pereira Klein¹, Thobias Toniolo da Silva¹, Danielle Ta-pia Bueno², Tais Poletti², Amanda Fonseca Leitzke², Janice Luehring Giongo^{1*}, Neftali Lenin Villarreal Carreno³, Andrés Mansilla⁴, Maria S. Astorga – España⁵, Claudio Martin Pereira de Pereira^{2*} and Rodrigo de Almeida Vaucher^{1*}

¹Department of Chemical, Pharmaceutical, and Food Sciences, Microorganism Biochemistry and Molecular Biology Research Laboratory, (LAPEBBIOM), Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

²Department of Chemical, Pharmaceutical, and Food Sciences, Laboratory for Lipidomic and Bio-Organic Research, Bioforensic Research Group, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

³Materials Science and Engineering Graduate Program, Technology Development Center, Novonano Laboratory, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

⁴Antarctic and Subantarctic Macroalgae Laboratory, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile.

⁵Department of Science and Natural Resources, Magallanes Region and Chilean Antarctic, University of Magallanes, Punta Arenas, Chile

***Corresponding author.**

Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Email addresses: rodvaucher@hotmail.com (R A Vaucher)

Abstract

The COVID-19 pandemic has caused an unprecedented health and economic crisis, highlighting the importance of developing new molecular tools to monitor and detect SARS-CoV-2. Hence, this study proposed to employ the carrageenan extracted from *Gigartina skottsbergii* algae as a probe for SARS-CoV-2 virus binding capacity and potential use in molecular methods. *G. skottsbergii* specimens were collected in the Chilean subantarctic ecoregion, and the carrageenan was extracted —using a modified version of Webber’s method—, characterized, and quantified. After 24 h of incubation with an inactivated viral suspension, the carrageenan’s capacity to bind SARS-CoV-2 was tested. The probe-bound viral RNA was quantified using the reverse transcription and reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) methods. Our findings showed that carrageenan extraction from seaweed has a similar spectrum to commercial carrageenan, achieving an excellent proportion of binding to SARS-CoV-2, with a yield of 8.3%. Viral RNA was also detected in the RT-LAMP assay. This study shows, for the first time, the binding capacity of carrageenan extracted from *G. skottsbergii*, which proved to be a low-cost and highly efficient method of binding to SARS-CoV-2 viral particles.

Keywords:

COVID-19; macroalga; carrageenan; probe; qRT-PCR; RT-LAMP

1. Introduction

SARS-CoV-2 infection (COVID-19) was declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) on March 11, 2020 [1], causing significant epidemiological, social, economic, cultural, and political repercussions [2]. Today, COVID-19 still has a devastating impact, according to the latest WHO report, with over 640 million cases and 6.6 million deaths worldwide [3].

COVID-19 symptoms generally occur 2 to 14 days after infection. Screening these patients is critical for managing viral contamination as it is a rapidly transmitting disease with no cure. Hence, detecting isolated samples from infected patients is the most effective way to contain its spread [4], especially since early diagnosis is crucial in evaluating suspected cases and for determining contagion levels [5]. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) has been the global standard for viral identification since the onset of the COVID-19 pandemic. This technique has been highly beneficial in diagnosing and surveilling suspected patients. However, alternative methods to identify SARS-CoV-2 have been proposed [6]. In the last two years, research has sought to develop new molecular strategies for detecting the virus. Recently, a new strip test-based quantitative molecular lateral flow assay for SARS-CoV-2 was developed based on a nucleic acid lateral flow assay of gold nanoparticles [7]; it proved to be a straightforward and inexpensive method with quick analysis and simultaneous quantification, providing high levels of detection and specificity.

Effective diagnostics that can rapidly and inexpensively diagnose COVID-19 are urgently needed. Given this concerning scenario, researchers worldwide have sought to develop a fast and easy-to-operate method to detect SARS-CoV-2 [8]. Natural constituents with probes for the binding capacity of the SARS-CoV-2 virus and the use of molecular methods are vital to become a powerful assessment tool [9]. Carrageenan, an algae-derived polymer used in pharmaceutical formulations, is one of these potential natural components. Its bioactive and physicochemical properties make it a promising biomaterial [10] for suspensions, thickeners, and stabilizers. The presence of sulfate esters in the molecule provides desirable properties for numerous applications, including gelling agents and water-holding capacity [11]. For instance, Lobregas, Bantang, and Camacho (2019) [12] developed an Hg^{2+} selective

colorimetric detection method employing carrageenan as both a reducing agent and a stabilizer as part of a probe kit with silver nanoparticles.

Carrageenan is also rich in specific sulfated polysaccharides, with a significant effect attributed to their strong ability to interfere with the initial attachment of the virus to target cells and host tissues [13,14]. Kwon et al. (2020) [15] demonstrated that carrageenan binds tightly to the S protein of SARS-CoV-2 in vitro, suggesting that they may act as bait to interfere with the binding of protein S to the sulfate co-receptor in host tissues, inhibiting viral infection. This interaction may occur in the presence of negatively charged sulfate groups, which can neutralize the virus's positively charged glycoproteins, resulting in a stable virion–carrageenan complex that prevents the virus from completing the infection process [16].

The seaweed *Gigartina skottsbergii*, class Rhodophyceae, also known as red algae, can be found in Argentina, Chile, and along the Antarctic Peninsula [17] and it is a rich natural source of carrageenan [18,19]. It is one of the most utilized seaweeds in Chile due to its high carrageenan content, representing over 70% of its dry weight [20]. Our research team previously investigated the biotechnological potential of subantarctic algae, such as lipidomics, and, more recently, using κ-carrageenan as a biodegradable film to activate natural oils with antimicrobial protection [21,22]. In addition, new and pioneering approaches to remove SARS-CoV-2 from water and sewage have been developed, along with alternative methods of diagnosing this virus in healthcare workers [2,6,23,24]. In this study, we aimed to extract and characterize carrageenan from the Chilean macroalgae *G. skottsbergii* for use in molecular methods as a binding probe for the SARS-CoV-2 virus. Our findings revealed, for the first time, that macroalgae have the potential for future applications in detecting SARS-CoV-2.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

2.1.1. Sampling

G. skottsbergii specimens were collected in January 2017 in the high meso-littoral zone of the San Juan region (53°43' S, 70°58' W) in the Chilean Subantarctic

ecoregion. The specimens were packed in thermal boxes filled with seawater and sanitized to eliminate epiphytes. The samples were dried in a JOST 700T air oven at 35 °C for 24–30 h and sprayed in a refrigerator model 226/2 (Lucadema, Brazil). Identification and classification were made, and the samples were placed in a freezer at -20 °C in dark plastic bags [22,25].

2.1.2. Materials

Commercially sourced carrageenan was obtained from Sigma Aldrich®, catalogued as C1013 (Kappa carrageenan). Primers were obtained from IDT Biotechnology (Coralville, IO, USA). Prof. Dr. Edison Luiz Durigon from the Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), Brazil, kindly provided the inactivated SARS-CoV-2 (SP02/human 2020/Br, GenBank accession number MT126808.1) virus.

2.2. Methods

2.2.1. Carrageenan Extraction

Carrageenan was extracted from a sample of *G. skottsbergii*. The extraction was performed according to Webber et al. (2012) [26], with modifications. The previously dried algae were briefly rinsed in running water to remove salts and dirt before being freeze-dried. Ten grams of the sample were weighed and soaked in distilled water (800 mL) for 1 h for rehydration. The solution was then placed in a water bath at 60 °C for 4 h. Filtration was conducted in a vacuum system using filter paper as the filter material to separate the carrageenan from the residue. The solid carrageenan was obtained by drying the filtered solution in an oven at 40 °C for 72 h. A schematic of the extraction process is illustrated in Figure 1.

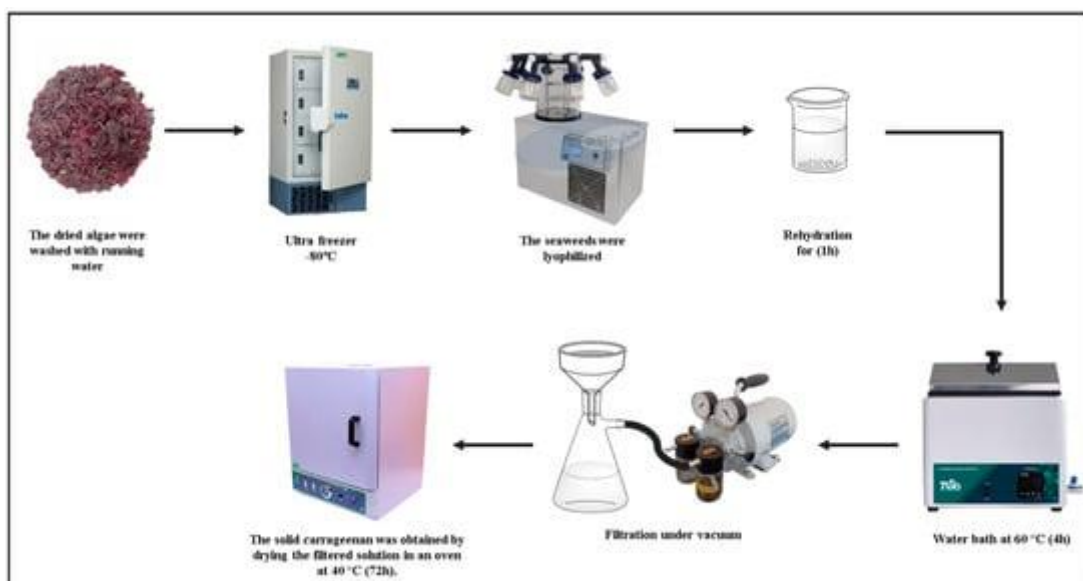


Figure 1. The carrageenan from *G. skottsbergii* graphical extraction process.

2.2.2. UV-Vis Scanning Spectroscopy

UV-vis scanning spectroscopy was performed in a Pro-Analysis UV-1600 spectrophotometer with data scanning between 290 and 500 nm using a 1 cm quartz cuvette. Then, 0.5 g of previously extracted carrageenan was solubilized in 100 mL of absolute ethanol under magnetic stirring at 37 °C for 40 min. Aliquots of 1.0 mL were collected and transferred into a volumetric flask containing 24 mL of ethanol; the final concentration was 0.2 mg/mL. The tests were performed in duplicate, and commercial k-carrageenan (Sigma) was used as a control.

2.2.3. (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid)) ABTS Assay

The ABTS assay was performed according to a previous protocol from our research group [27], adapted from Re et al. (1999) [28]. A 7 mM ABTS^{•+} solution was prepared with a 2.45 mM sodium persulfate solution in PBS (pH 7.4). The solution was allowed to react in the dark at room temperature for 12–16 h before use. The ABTS^{•+} solution was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) until the absorbance reached 0.700 ± 0.02 at 734 nm. The test compounds were serially diluted two-fold in PBS (500–7.0 μM). For every 3 mL of the serially diluted test compound, 1 mL of ABTS^{•+} solution was added and allowed to react for 30 s before measuring the absorbance at 734 nm. PBS was used as the negative control and Trolox as the

positive control (4.5 mg/mL). The test compounds' ABTS^{•+} scavenging activity was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Scavenging activity} = [100 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})/\text{Abs}_{\text{abts}}] \times 100]$$

where $\text{Abs}_{\text{sample}}$ was the absorbance from the compound solution, $\text{Abs}_{\text{blank}}$ was the absorbance for the negative control, and Abs_{abts} was the absorbance for the PBS containing ABTS^{•+} only.

2.2.4. 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Assay

The antioxidant activity was assessed by DPPH assay, according to Choi et al. (2002) [29]. The compounds were serially diluted in 2.5 mL of ethanol, and 1 mL of a 0.3 mM DPPH solution was added to each concentration. The samples were allowed to react at room temperature in the dark for at least 40 min, followed by reading the absorbance of the mixture at 518 nm. Absolute ethanol was used as the negative control and Trolox (5.68 mg/mL) as the positive control. The DPPH scavenging activity was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Scavenging activity} = [100 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})/\text{Abs}_{\text{dpph}}] \times 100]$$

where $\text{Abs}_{\text{sample}}$ was the absorbance from the compound solution, $\text{Abs}_{\text{blank}}$ was the absorbance for the negative control, and Abs_{dpph} was the absorbance for the ethanol containing DPPH only.

2.2.5. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform (ATR-FTIR) Spectroscopy

The ATR-FTIR spectroscopy was performed using the IR model Spirit (Shimadzu, Kyoto, Japan). Commercial κ -carrageenan (Sigma) and carrageenan extracted from the macroalgae were scanned at 400–4000 cm^{-1} , 100 scans, transmittance mode, and 4 cm^{-1} resolution.

2.2.6. Qualitative High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Analyses of commercial carrageenan (Sigma Aldrich) and extracted carrageenan were performed by chromatographic analysis using a method adapted from Navikaite [30] (Thermo Scientific UltiMate 3000 UHPLC system, Waltham, MA, USA). The mobile phase of isocratic elution comprised a mixture of water and formic acid (0.01%) (91.5:8.5). At the same time, solution B was a mixture of water, acetonitrile, methanol,

and formic acid (0.01%) (41.5:22.5:22.5:8.5). The analysis was conducted at 30 °C for 5 min, with an injection volume of 10 µL, a flow rate of 1.0 mL/min, and a detection wavelength of 535 nm. A C18 column (Ascentis Express 5 µm—Fused-Core®) was coupled to a UV-Vis detector.

2.2.7. Carrageenan As a Binding Probe for SARS-CoV-2

Carrageenan (10 mg) was dried at 37 °C for 24 h and transferred to a microtube containing 1.5 mL of ultra-purified water (free of RNase enzymes). Then, 150 µL of the inactivated SARS-CoV-2 viral suspension (2.5×10^6 copies/mL) was added, followed by incubation with shaking at 200 rpm and 28 °C for 24 h. Subsequently, the supernatant and adsorbent were removed and placed in another microtube, and the viral RNA was extracted.

2.2.8. RNA Extraction

The SARS-CoV-2 viral RNA was extracted from carrageenan after a binding assay using a MagMax™ Core Nucleic Acid Purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The extracted RNA was quantified by NanoDrop® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Approximately 10 ng of RNA was used to perform the RT-qPCR detection.

2.2.9. Real-Time Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

The primer and probe used in the PCR reactions were designed according to the Center for Disease Control and Prevention [31]. A reaction of 25 µL (final volume) was used, with the subsequent volumes added to the 1× concentrated master mix: 5 µL of sample RNA, 12.5 µL of 2× reaction buffer, 1 µL of Superscript™ III One-Step with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Darmstadt, Germany), 0.4 mM of each dNTP, 0.4 µL of a 50 mM MgSO₄ solution (Invitrogen), 1 µg of non-acetylated bovine albumin (Roche), 10 µM of each primer 2019-nCoV N1-F2019-nCoV N1 (5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT3'), 2019-nCoV N1-R2019-nCoV N1 (5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG3'), 2019-nCoV N1-P2019-nCoV N1 probe (5'-FAM—ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC—BBQ 3'), and DEPC water. The reaction began at 55 °C for 10 min for reverse transcription, followed by 95 °C for 3 min, 40

cycles of 95 °C for 15 s, and 58 °C for 30 s (7500 Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2.10. Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

The RT-LAMP assay was carried out on isolated RNA after binding the carrageenan probe and SARS-CoV-2 virus particles. The RT-LAMP assay was performed according to Trassante [6]. A reaction mix with a final volume of 25 µL was prepared using the WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix Kit according to the manufacturer's instructions. Park et al. [32] proposed employing the oligonucleotides for the N gene (Nsp3_1-61). The concentrations in each Nsp3_1-61 oligonucleotide reaction were 0.8 µM of F3 and B3, 0.4 µM of FIP and BIF, and 0.2 µM of LF and LB. Following the preparation of the reaction mixtures, the tubes were placed in a thermal block at 65 °C for 30 min before measurement.

2.3. Statistical Methodology

Data for duplicates are expressed as the mean and standard deviation for each experimental point and performed in duplicates. One-way variance analysis (ANOVA) was used to analyze the data, followed by Tukey tests with a significance level of 5%.

3. Results and Discussion

3.1. Carrageenan Extraction Process

The *G. skottsbergii* biomass was collected, as with other algae recently studied [33], in the Chilean subantarctic region in the Strait of Magellan in Puerto del Hambre (53°36' S, 70°55' W; Figure 2).

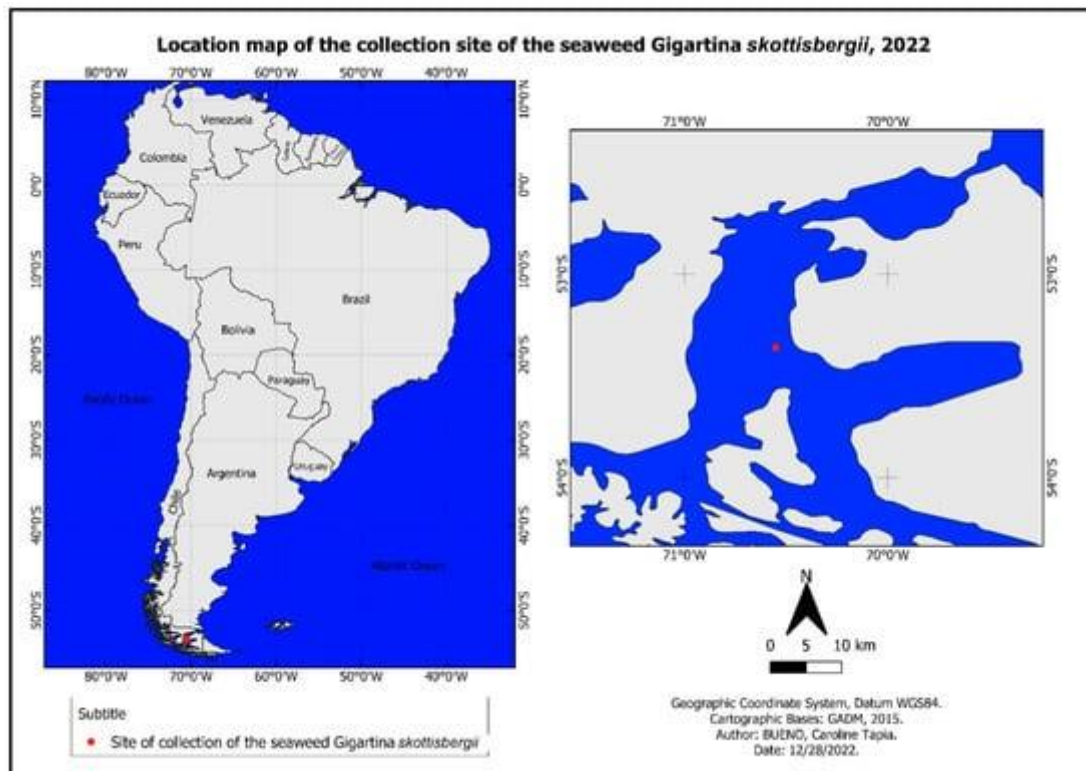


Figure 2. Location of the *G. skottsbergii* seaweed collected.

Optimum parameters were obtained for the time and extraction temperature of the *G. skottsbergii* macroalgae using Webber's adapted method [26]. The obtained material consistency in Figure 3 suggest that the models are well-adjusted.



Figure 3. Sample of carrageenan extracted from the red macroalgae *G. skottsbergii*.

3.2. UV-Vis Scanning Spectroscopy

The UV spectrophotometric analysis detected carrageenan extracted from the macroalgae *G. skottsbergii*. A comparison of the extract's UV spectrum to that of κ -carrageenan (Sigma®) is provided in Figure 4. Their similarity is evident, as no visible peak is shown in the 300–500 nm range, corroborating data reported elsewhere [34,35,36].

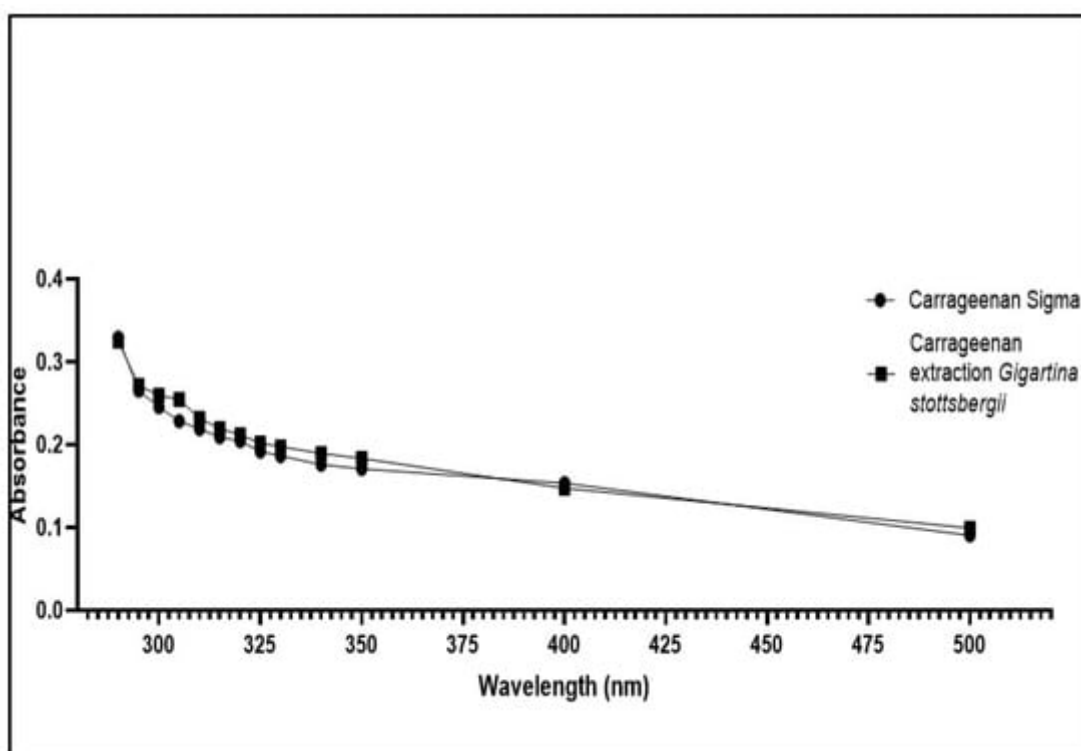


Figure 4. Absorption spectra of carrageenan extraction from the macroalgae *G. skottsbergii* and Sigma® κ -carrageenan (standard).

3.3. Radical Scavenging Capacity

The antioxidant activity of test compounds was evaluated using the 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity.

Our results revealed that the carrageenan extraction from the macroalgae *G. skottsbergii* was successfully compared to commercial carrageenan (Figure 5A,B), in

which very similar values may be achieved at different concentrations. Both outcomes were compared with the positive control group (Trolox), demonstrating that the experimental carrageenan has a much greater antioxidant capacity than the control group. Moreover, our findings indicate that their values are similar despite the carrageenan extracted from the macroalgae *G. skottsbergii* having a lower antioxidant potential than the commercial carrageenan.

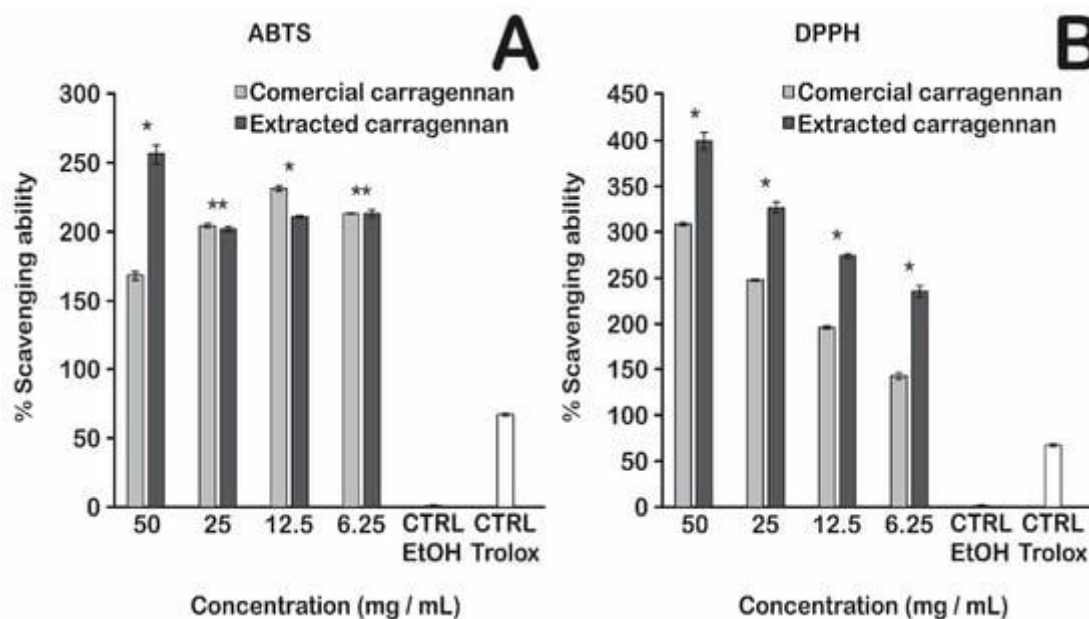


Figure 5. (A) ABTS and (B) DPPH assays of *G. skottsbergii* seaweed carrageenan extraction and sigma κ -carrageenan; (*) indicate a difference and (**) indicate no statistical difference.

The antioxidant activity of κ -carrageenan may be related to its degree of polymerization, reduced sugar content, sulfate groups, and terminal structure [37]. Yuan et al. (2005) [38] were among the first to report that carrageenan oligosaccharides isolated from *Kappaphycus striatus* macroalgae and their super sulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives have antioxidant activity in vitro. Suganya et al. (2016) [39] observed that carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* macroalgae and commercial carrageenan (Sigma-Aldrich) exhibit strong antioxidant activity and the capacity to scavenge hydroxyl, nitric oxide, and DPPH radicals.

3.4. ATR-FTIR Spectroscopy

The ATR-FTIR spectrum of the carrageenan extracted from the *G. skottsbergii* macroalgae compared to κ -carrageenan from the Sigma standard is shown in Figure 6. Both spectra have overlapping bands at 3400, 1650, 1200, 950, 800, 700, and 550 cm^{-1} . Our findings are consistent with Muthulakshmi et al. (2021) [36], who observed spectra for κ -carrageenan at 2360, 1450, 1400, 1194, 1123, 1101, 753, 656, and 601 cm^{-1} .

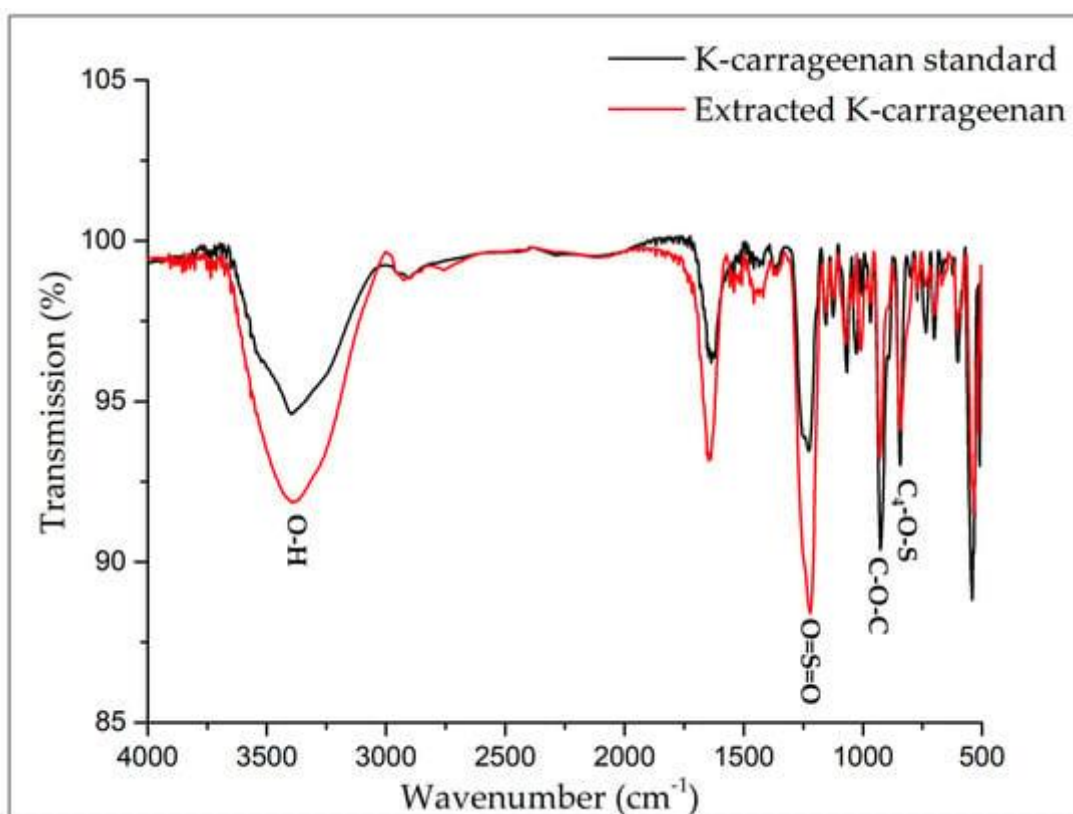


Figure 6. Extraction from the *G. skottsbergii* macroalgae (red) and standard κ -carrageenan (black) by ATR-FTIR analysis [42].

The carrageenan spectra revealed the main features of carrageenan compared to the extracted *G. skottsbergii* carrageenan (Figure 6). Furthermore, ATR-FTIR analysis demonstrated the existence of κ -carrageenan via high absorption bands at 930 cm^{-1} (CO of 3,6-anhydrogalactose) and 845 cm^{-1} (CO-SO₄ in C4 of galactose). The spectra also showed high absorption in the 1000–1100 cm^{-1} range, which is typical of polysaccharides, whereas the 1010–1080 cm^{-1} area is attributed to the glycosidic bonds found in all carrageenans. Notably, water is known to have a high absorbance

at 1640–1650 cm^{-1} [40,41]. These data confirmed similar spectra, demonstrating the quality of the carrageenan. Thus, compared to the sigma κ -carrageenan standard, the ATR-FTIR results showed that carrageenan extraction from the *G. skottsbergii* macroalgae was effective.

3.5. κ -Carrageenan Determination by UHPLC-UV-Vis

The extracted sample was confirmed to be κ -carrageenan using UHPLC/UV-Vis analysis (Figure 7), which required a standard κ -carrageenan. The peaks in both chromatograms had the same chromatographic profile and retention time, indicating that the extracted sample was κ -carrageenan.

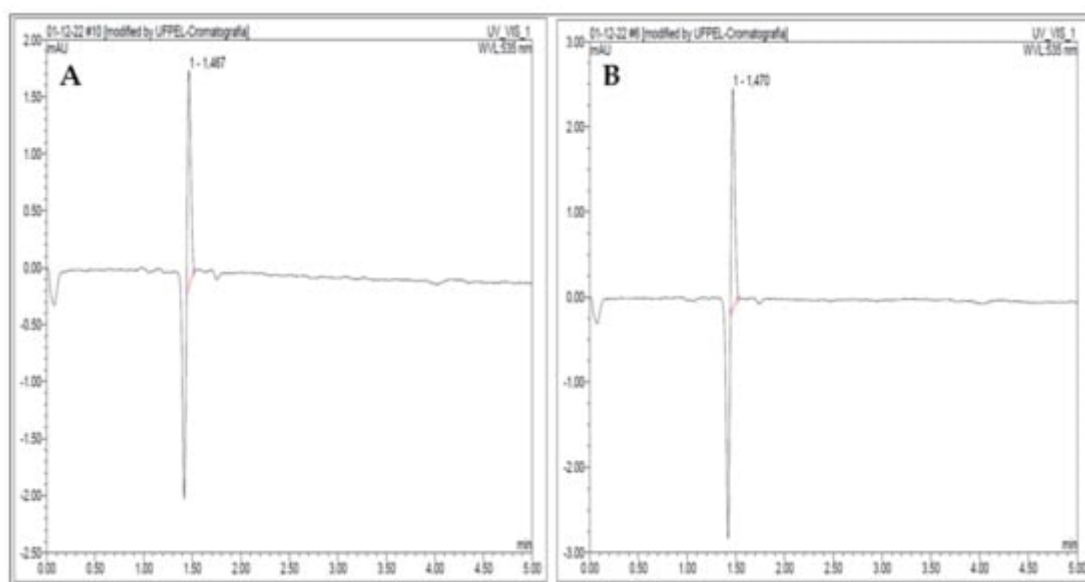


Figure 7. Chromatograms of the extracted carrageenan (a) and standard carrageenan (b).

3.6. Binding Capacity Evaluation of *G. Skottsbergii* Carrageenan with SARS-CoV-2 Viral Particles

The RT-qPCR results in Figure 4 refer to the incubation of *G. skottsbergii* extracted carrageenan in an inactivated SARS-CoV-2 suspension during 24 h of continuous agitation. By analyzing the amplification plot (Figure 8), one can observe that the N1 gene was detected in both the control (SARS-CoV-2 + H₂O) and tested material (carrageenan + SARS-CoV-2) samples, presenting cycle threshold (CT) values of 24.47 ± 0.15 and 32.87 ± 0.42 , respectively. Nevertheless, the supernatant sample showed no detectable CT, indicating that the carrageenan

captured the viral particles, likely due to the binding of carrageenan's highly charged macromolecules to the viral surface, as suggested elsewhere [43,44,45].

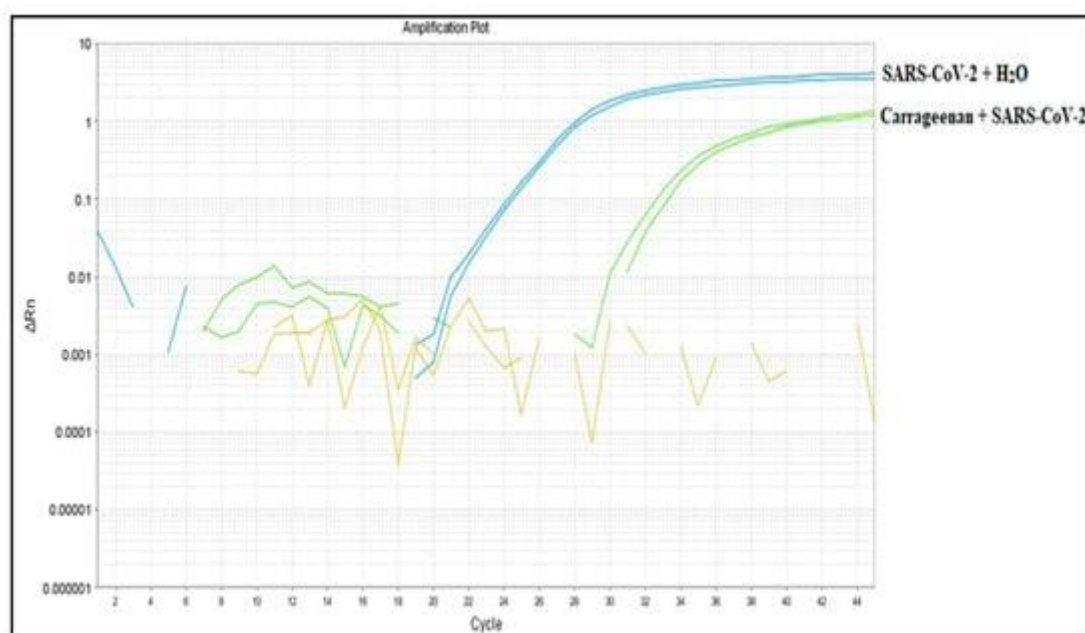


Figure 8. Evaluation of the binding capacity of SARS-CoV-2 with carrageenan extracted from *G. skottsbergii* macroalgae using RT-qPCR.

The CT values are inversely proportional to the viral load [44,45] as viral DNA yield doubles at each cycle [44]. Therefore, we could estimate the viral particle's yield in 240.392 ± 1.042 viral particles/mL for the SARS-CoV-2 + H₂O sample and 2.002 ± 36.0 viral particles/mL for the carrageenan + SARS-CoV-2 sample. The estimated binding rate of carrageenan to viral particles was 8.3%.

Studies conducted throughout the COVID-19 pandemic have reported high sensibility and specificity values of RT-qPCR in COVID-19 diagnosis [31,46]. Hence, it is a highly useful tool that provides a solid basis for developing novel diagnostic and surveillance methods in clinical and environmental samples [6,23,47]. The ability of carrageenan-mediated viral RNA extraction, as illustrated in Figure 9, further emphasizes the biotechnological potential of this widely available subantarctic macroalgae. The study of Schütz et al. [48] on the prophylactic use of carrageenan-containing nasal and mouth sprays to prevent SARS-CoV-2 infection is an excellent example of the broad applicability of this biomaterial. In fact, researchers have even reported antiviral activity against other viral pathogens, such as herpes viruses [49,50] and papilloma virus [51]. Therefore, further research with carrageenan may lead to

novel molecular detection methods for SARS-CoV-2 and other viruses or even improve currently available methods.

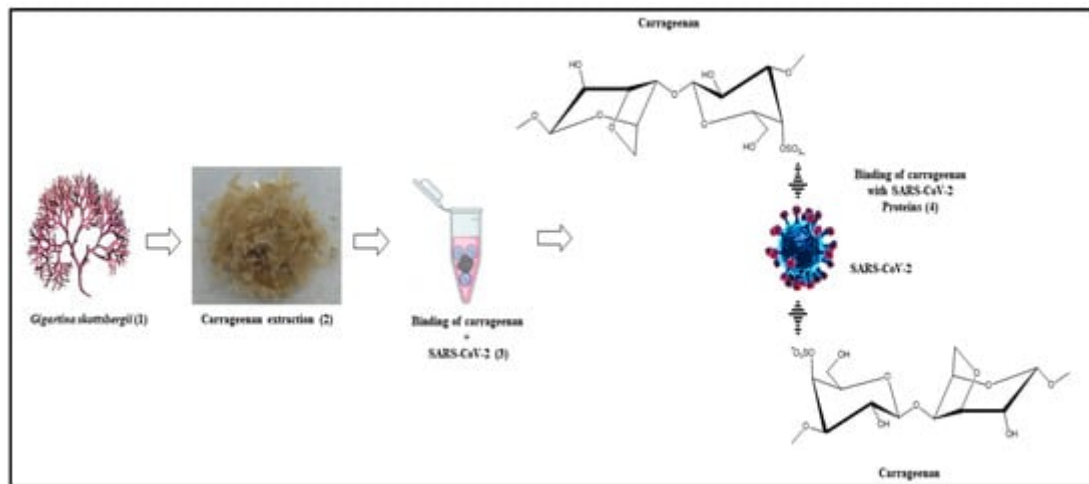


Figure 9. Graphical representation for SARS-CoV-2 viral particles binding in *G. skottsbergii* macroalgae (1) and the carrageenan extract (2). Binding occurs after incubation (3). Viral RNA was isolated directly from carrageenan (4).

3.7. RT-LAMP Detection

In order to evaluate whether the 8.3% binding rate of carrageenan to the SARS-CoV-2 virus is applicable in diagnostic routines, we chose an alternative molecular assay called RT-LAMP. Figure 10 demonstrates the presence of viral RNA detected by RT-LAMP after binding the viral particles to carrageenan in the binding experiments in an aqueous medium (Figure 10). It is evident that carrageenan was able to sequester SARS-CoV-2 viral particles in this environment.

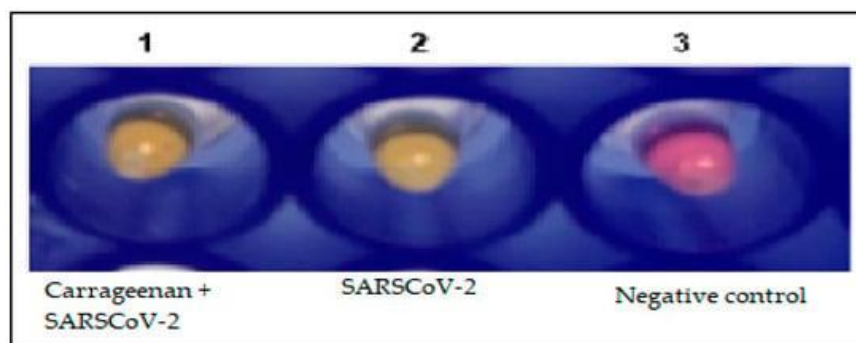


Figure 10. Detection of SARS-CoV-2 by the RT-LAMP assay after virus binding to carrageenan. Channel 1 and 2: positive result for SARS-CoV-2 detection. Channel 3: negative control. Yellow reaction: amplification. Pink reaction: no amplification.

The RT-LAMP assay has been widely used during the COVID-19 pandemic, and we have employed it in some studies to detect SARS-CoV-2 in different clinical samples [6,52,53]; this is a more specific and less sensitive method than an RT-PCR assay to detect SARS-CoV-2.

Kitajima et al. [54] reported a high concordance rate of 93.3% between RT-PCR and RT-LAMP in sputum and a nasopharyngeal sample containing 10.2 and 23.4 copies per 10 μ L, respectively. Furthermore, RT-LAMP exhibits a high degree of specificity (98.5%), sensitivity (87%), positive predictive value (97.9%), and negative predictive value (90.2%) for SARS-CoV-2 detection. Notably, limit of detection (LOD) has been reported in other studies with high sensitivity and specificity rates, with a LOD higher and lower than 100 copies/ μ L, as demonstrated by Cao et al. (2021) [55] and Broughton et al. (2020) [56], who found 10 and 225 copies/ μ L, respectively, while Zhang et al. (2021) [57] and Agrawal et al. (2020) [58] used the N gene and obtained 4 and 40 copies/ μ L, respectively. Our results showed a value of roughly 2000 viral copies/mL, enabling this technique to detect the viral load linked to carrageenan.

The RT-LAMP can be reliably performed, demonstrating that the 8.3% linked rate represents an excellent evolution for future applications. We believe that higher carrageenan concentrations may improve the binding rate. However, we must ensure that this increase does not interfere with transmitting the genetic material of the virus.

Another important aspect of using carrageenan prior to viral genetic material inheritance is the potential improvement in sensitivity. Its use may increase the sensitivity of molecular methods, particularly concerning borderline diagnosis; that is, in samples with low viral load, the carrageenan-SARS-CoV-2 connection could facilitate virus removal from clinical samples, and materials with small quantities of the virus could increase the probability of detection in diagnostic methods. In the COVID-19 diagnostic scenario, this would reduce the number of false negatives.

4. Conclusions

Carrageenan extracted from *G. skottsbergii* macroalgae demonstrated the ability to bind to viral particles of SARS-CoV-2 in an aqueous environment within 24 h of incubation. This was shown with the discovery of viral RNA isolated directly from carrageenan. The RT-LAMP test, which detected the presence of SARS-CoV-2 RNA

material, validated the 8.3% binding rate. Thus, it is clear that carrageenan derived from subantarctic macroalgae has promising uses in diagnostic and therapeutic applications and various fields of biotechnology.

Funding: This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance code 001, by CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and FAPERGS (Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul) 20/2551-0000263-2]. INOVA CLUSTERS TECNOLÓGICOS-FAPERGS 22/2551-0000840-2.

Acknowledgments: The authors also thank the Geographer Doctor Caroline Tapia Bueno for confection the collection location map.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19 - 11 March 2020 Available online: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed on 13 December 2022).
2. Schoeler, G.P.; Afonso, T.F.; Demarco, C.F.; dos Santos Barboza, V.; Sant'anna Cadaval, T.R.; Igansi, A.V.; Gelesky, M.A.; Giongo, J.L.; de Almeida Vaucher, R.; de Avila Delucis, R.; et al. SARS-CoV-2 Removal with a Polyurethane Foam Composite. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, doi:10.1007/s11356-022-23758-3.
3. WHO, W.H.O. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data Available online: <https://covid19.who.int/> (accessed on 13 December 2022).
4. Pokhrel, P.; Hu, C.; Mao, H. Detecting the Coronavirus (CoVID-19). *ACS Sensors* **2020**, *5*, 2283–2297.
5. Xi, J.; Lei, L.R.; Zouzas, W.; April Si, X. Nasally Inhaled Therapeutics and Vaccination for COVID-19: Developments and Challenges. *MedComm* **2021**, *2*, 569–586.
6. Trassante, C.M.; Barboza, V. dos S.; Rocha, L. dos S.; Correa, P.M.; Luchese, C.; Wilhelm, E.A.; Pereira de Pereira, C.M.; Baldissera, M.D.; Rech, V.C.; Giongo, J.L.; et al. Detection of SARS-CoV-2 Virus Using an Alternative Molecular Method and Evaluation of Biochemical, Hematological, Inflammatory, and Oxidative Stress in Healthcare Professionals. *Microb. Pathog.* **2021**, *158*, doi:10.1016/j.micpath.2021.104975.
7. Maglaras, P.; Lilis, I.; Paliogianni, F.; Bravou, V.; Kalogianni, D.P. A Molecular Lateral Flow Assay for SARS-CoV-2 Quantitative Detection. *Biosensors* **2022**,

12, 926, doi:10.3390/bios12110926.

8. Talwar, C.S.; Park, K.H.; Ahn, W.C.; Kim, Y.S.; Kwon, O.S.; Yong, D.; Kang, T.; Woo, E. Detection of Infectious Viruses Using Crispr-Cas12-Based Assay. *Biosensors* **2021**, *11*, doi:10.3390/bios11090301.
9. Song, S.; Peng, H.; Wang, Q.; Liu, Z.; Dong, X.; Wen, C.; Ai, C.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Zhu, B. Inhibitory Activities of Marine Sulfated Polysaccharides against SARS-CoV-2. *Food Funct.* **2020**, *11*, 7415–7420, doi:10.1039/d0fo02017f.
10. Pacheco-Quito, E.M.; Ruiz-Caro, R.; Veiga, M.D. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2020**, *18*.
11. Martin, A.H.; Douglas Goff, H.; Smith, A.; Dalglish, D.G. Immobilization of Casein Micelles for Probing Their Structure and Interactions with Polysaccharides Using Scanning Electron Microscopy (SEM). *Food Hydrocoll.* **2006**, *20*, 817–824, doi:10.1016/j.foodhyd.2005.08.004.
12. Lobregas, M.O.S.; Bantang, J.P.O.; Camacho, D.H. Carrageenan-Stabilized Silver Nanoparticle Gel Probe Kit for Colorimetric Sensing of Mercury (II) Using Digital Image Analysis. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2019**, *26*, doi:10.1016/j.sbsr.2019.100303.
13. Mandal, N.; De, N.; Jana, P.; Sannigrahi, A.; Chattopadhyay, K. Correlation between CNS Tuberculosis and the COVID-19 Pandemic: The Neurological and Therapeutic Insights. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*, 2789–2792.
14. Ana, P.; Nathalie, B.; Gilles, B.; Daniel, R.; Tomás, M.S.; Yolanda, F.P. Anti-Herpes Simplex Virus (HSV-1) Activity and Antioxidant Capacity of Carrageenan-Rich Enzymatic Extracts from *Solieria Filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *168*, 322–330, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.064.
15. Kwon, P.S.; Oh, H.; Kwon, S.J.; Jin, W.; Zhang, F.; Fraser, K.; Hong, J.J.; Linhardt, R.J.; Dordick, J.S. Sulfated Polysaccharides Effectively Inhibit SARS-CoV-2 in Vitro. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 1–4, doi:10.1038/s41421-020-00192-8.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Carragenina IF082-00. **2019**.
17. D'Archino, R.; Nelson, W.A.; Sutherland, J.E. Unnamed for over 30 Years: *Gigartina Falshawiae* Sp. Nov. (Gigartinaceae, Rhodophyta) and Its Confusion with *Iridaea Tuberculosa* in New Zealand. *Phycologia* **2020**, *59*, 45–53, doi:10.1080/00318884.2019.1667187.
18. Berneira, L.M.; de Santi, I.I.; da Silva, C.C.; Venzke, D.; Colepicolo, P.; Vaucher, R. de A.; dos Santos, M.A.Z.; de Pereira, C.M.P. Bioactivity and Composition of Lipophilic Metabolites Extracted from Antarctic Macroalgae. *Brazilian J. Microbiol.* **2021**, *52*, 1275–1285, doi:10.1007/s42770-021-00475-6.
19. Westermeier, R.; González, C.; Murúa, P.; Morales, J.; Patiño, D.J.; Fabres, N.;

- Zamorano, J.; Müller, D.G. Seasonal Variation of Carrageenan Yield, Gel Strength and Viscosity in *Sarcopeltis* (Ex *Gigartina*) *Skottsbergii* from Southern Chile. *Phycol. Res.* **2022**, *70*, 42–49, doi:10.1111/pre.12467.
20. Martiny, T.R.; Pacheco, B.S.; Pereira, C.M.P.; Mansilla, A.; Astorga-España, M.S.; Dotto, G.L.; Moraes, C.C.; Rosa, G.S. A Novel Biodegradable Film Based on κ -Carrageenan Activated with Olive Leaves Extract. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 3147–3156, doi:10.1002/fsn3.1554.
 21. dos Santos, M.A.Z.; Berneira, L.M.; Goulart, N.L.; Mansilla, A.; Astorga-España, M.S.; de Pereira, C.M.P. Rhodophyta, Ochrophyta and Chlorophyta Macroalgae from Different Sub-Antarctic Regions (Chile) and Their Potential for Polyunsaturated Fatty Acids. *Rev. Bras. Bot.* **2021**, *44*, 429–438, doi:10.1007/s40415-021-00712-0.
 22. Demarco, C.F.; Afonso, T.F.; Schoeler, G.P.; Barboza, V. dos S.; Rocha, L. dos S.; Pieniz, S.; Giongo, J.L.; Vaucher, R. de A.; Igansi, A.V.; Cadaval, T.R.S.A.; et al. New Low-Cost Biofilters for SARS-CoV-2 Using *Hymenachne Grumosa* as a Precursor. *J. Clean. Prod.* **2022**, *331*, doi:10.1016/j.jclepro.2021.130000.
 23. Barboza, V. dos S.; Domingues, W.B.; de Souza, T.T.; Collares, T.V.; Seixas, F.K.; Pacheco, B.S.; Sousa, F.S.S.; Oliveira, T.L.; de Lima, M.; de Pereira, C.M.P.; et al. Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay as a Rapid Molecular Diagnostic Tool for COVID-19 in Healthcare Workers. *J. Clin. Virol. plus* **2023**, 100134, doi:10.1016/J.JCVP.2023.100134.
 24. de Freitas, S.C.; Berneira, L.M.; dos Santos, M.A.Z.; Poletti, T.; Mansilla, A.; Astorga-España, M.S.; Garcia, M.O.; Hartwig, D.D.; Hübner, S. de O.; de Pereira, C.M.P. Bioactivity Evaluation and Composition of Extracts from Sub-Antarctic Macroalgae *Mazzaella Laminarioides* at Distinct Development Phases. *Rev. Bras. Bot.* **2020**, *43*, 689–696, doi:10.1007/s40415-020-00661-0.
 25. Webber, V.; de 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. *Food Sci. Technol.* **2012**, *32*, 812–818, doi:10.1590/S0101-20612012005000111.
 26. Cerveira, M.M.; Vianna, H.S.; Ferrer, E.M.K.; da Rosa, B.N.; de Pereira, C.M.P.; Baldissera, M.D.; Lopes, L.Q.S.; Rech, V.C.; Giongo, J.L.; de Almeida Vaucher, R. Bioprospection of Novel Synthetic Monocurcuminoids: Antioxidant, Antimicrobial, and in Vitro Cytotoxic Activities. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *133*, doi:10.1016/J.BIOPHA.2020.111052.
 27. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237, doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
 28. Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park,

- S.H.; Kim, S.K. Antioxidant Activity and Free Radical Scavenging Capacity between Korean Medicinal Plants and Flavonoids by Assay-Guided Comparison. *Plant Sci.* **2002**, *163*, 1161–1168, doi:10.1016/S0168-9452(02)00332-1.
29. Navikaite, V.; Simanaviciute, D.; Klimaviciute, R.; Jakstas, V.; Ivanauskas, L. Interaction between κ - And ι -Carrageenan and Anthocyanins from *Vaccinium Myrtillus*. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *148*, 36–44, doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.059.
 30. Centers for Disease Control and Prevention et al CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-NCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel 2020 Available online: <https://www.fda.gov/media/134922/download> (accessed on 13 December 2022).
 31. Park, G.-S.; Ku, K.; Baek, S.-H.; Kim, S.-J.; Kim, S. II; Kim, B.-T.; Maeng, J.-S. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting SARS-CoV-2. *J. Mol. Diagnostics* **2020**, doi:10.1016/j.jmoldx.2020.03.006.
 32. Maciel, O.M.C.; Tavares, R.S.N.; Caluz, D.R.E.; Gaspar, L.R.; Debonisi, H.M. Photoprotective Potential of Metabolites Isolated from Algae-Associated Fungi *Annulohyphoxylon Stygium*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2018**, *178*, 316–322, doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.11.018.
 33. Pandey, S.; Goswami, G.K.; Nanda, K.K. Green Synthesis of Biopolymer-Silver Nanoparticle Nanocomposite: An Optical Sensor for Ammonia Detection. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 583–589, doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.06.033.
 34. Rhim, J.W.; Wang, L.F. Preparation and Characterization of Carrageenan-Based Nanocomposite Films Reinforced with Clay Mineral and Silver Nanoparticles. *Appl. Clay Sci.* **2014**, *97–98*, 174–181, doi:10.1016/j.clay.2014.05.025.
 35. Muthulakshmi, L.; Pavithra, U.; Sivaranjani, V.; Balasubramanian, N.; Sakthivel, K.M.; Pruncu, C.I. A Novel Ag/Carrageenan–Gelatin Hybrid Hydrogel Nanocomposite and Its Biological Applications: Preparation and Characterization. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2021**, *115*, doi:10.1016/j.jmbbm.2020.104257.
 36. Khotimchenko, M.; Tiasto, V.; Kalitnik, A.; Begun, M.; Khotimchenko, R.; Leonteva, E.; Bryukhovetskiy, I.; Khotimchenko, Y. Antitumor Potential of Carrageenans from Marine Red Algae. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *246*.
 37. Yuan, H.; Zhang, W.; Li, X.; Lü, X.; Li, N.; Gao, X.; Song, J. Preparation and in Vitro Antioxidant Activity of κ -Carrageenan Oligosaccharides and Their Oversulfated, Acetylated, and Phosphorylated Derivatives. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 685–692, doi:10.1016/J.CARRES.2004.12.026.
 38. Suganya, A.M.; Sanjivkumar, M.; Chandran, M.N.; Palavesam, A.; Immanuel, G. Pharmacological Importance of Sulphated Polysaccharide Carrageenan

- from Red Seaweed *Kappaphycus Alvarezii* in Comparison with Commercial Carrageenan. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *84*, 1300–1312, doi:10.1016/j.biopha.2016.10.067.
39. Pereira, L.; Sousa, A.; Coelho, H.; Amado, A.M.; Ribeiro-Claro, P.J.A. Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR Spectroscopy for Identification of Some Seaweed Phycocolloids. *Biomol. Eng.* **2003**, *20*, 223–228, doi:10.1016/S1389-0344(03)00058-3.
 40. Pereira, L.; Amado, A.M.; Critchley, A.T.; van de Velde, F.; Ribeiro-Claro, P.J.A. Identification of Selected Seaweed Polysaccharides (Phycocolloids) by Vibrational Spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1903–1909, doi:10.1016/j.foodhyd.2008.11.014.
 41. Şen, M.; Erboz, E.N. Determination of Critical Gelation Conditions of κ-Carrageenan by Viscosimetric and FT-IR Analyses. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1361–1364, doi:10.1016/J.FOODRES.2010.03.021.
 42. Morokutti-Kurz, M.; Fröba, M.; Graf, P.; Große, M.; Grassauer, A.; Auth, J.; Schubert, U.; Prieschl-Grassauer, E. Iota-Carrageenan Neutralizes SARS-CoV-2 and Inhibits Viral Replication in Vitro. *PLoS One* **2021**, *16*, doi:10.1371/journal.pone.0237480.
 43. Mutesa, L.; Ndishimye, P.; Butera, Y.; Souopgui, J.; Uwineza, A.; Rutayisire, R.; Ndoricimpaye, E.L.; Musoni, E.; Rujeni, N.; Nyatanyi, T.; et al. A Pooled Testing Strategy for Identifying SARS-CoV-2 at Low Prevalence. *Nature* **2021**, *589*, 276–280, doi:10.1038/s41586-020-2885-5.
 44. Bustin, S.A.; Benes, V.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W. Quantitative Real-Time RT-PCR - A Perspective. *J. Mol. Endocrinol.* **2005**, *34*, 597–601.
 45. Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.W.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 Novel Coronavirus (2019-NCoV) by Real-Time RT-PCR. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
 46. Soares da Silva, M.; Gularte, J.S.; Demoliner, M.; Hansen, A.W.; Heldt, F.H.; Filippi, M.; Luckmann, C.B.; Malayhka de Abreu Góes Pereira, V.; de Almeida Vaucher, R.; Barboza, V. dos S.; et al. Brief Dispersion of a Putative B.1.1.28-Derived SARS-CoV-2 Lineage Harboring Additional N234P and E471Q Spike Protein Mutations in Individuals Crossing the Argentina-Brazil Border. *Travel Med. Infect. Dis.* **2022**, *49*, 102390, doi:10.1016/J.TMAID.2022.102390.
 47. Schutz, D.; Conzelmann, C.; Fois, G.; Groß, R.; Weil, T.; Wettstein, L.; Stenger, S.; Zelikin, A.; Hoffmann, T.K.; Frick, M.; et al. Carrageenan-Containing over-the-Counter Nasal and Oral Sprays Inhibit SARS-CoV-2 Infection of Airway Epithelial Cultures. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **2021**, *320*, L750–L756, doi:10.1152/ajplung.00552.2020.
 48. Carlucci, M.J.; Pujol, C.A.; Cancia, M.; Nosedá, M.D.; Matulewicz, M.C.; Damonte, E.B.; Cerezo, A.S. *Antitherpetic and Anticoagulant Properties of*

Carrageenans from the Red Seaweed Gigartina Skottsbergii and Their Cyclized Derivatives: Correlation between Structure and Biological Activity; 1997; Vol. 20.

49. Diogo, J. V.; Novo, S.G.; González, M.J.; Ciancia, M.; Bratanich, A.C. Antiviral Activity of Lambda-Carrageenan Prepared from Red Seaweed (*Gigartina Skottsbergii*) against BoHV-1 and SuHV-1. *Res. Vet. Sci.* **2015**, *98*, 142–144, doi:10.1016/J.RVSC.2014.11.010.
50. Minami, K.; Masutani, R.; Suzuki, Y.; Kubota, M.; Osaka, N.; Nakanishi, T.; Nakano, T.; Ukimura, A. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA Quantification by RT-LAMP Compared to RT-QPCR. *J. Infect. Chemother.* **2021**, *27*, 1068–1071, doi:10.1016/j.jiac.2021.05.004.
51. Aoki, M.N.; de Oliveira Coelho, B.; Góes, L.G.B.; Minoprio, P.; Durigon, E.L.; Morello, L.G.; Marchini, F.K.; Riediger, I.N.; do Carmo Debur, M.; Nakaya, H.I.; et al. Colorimetric RT-LAMP SARS-CoV-2 Diagnostic Sensitivity Relies on Color Interpretation and Viral Load. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, doi:10.1038/s41598-021-88506-y.
52. Kitajima, H.; Tamura, Y.; Yoshida, H.; Kinoshita, H.; Katsuta, H.; Matsui, C.; Matsushita, A.; Arai, T.; Hashimoto, S.; Iuchi, A.; et al. Clinical COVID-19 Diagnostic Methods: Comparison of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) and Quantitative RT-PCR (QRT-PCR). *J. Clin. Virol.* **2021**, *139*, doi:10.1016/j.jcv.2021.104813.
53. Cao, Y.; Wu, J.; Pang, B.; Zhang, H.; Le, X.C. CRISPR/Cas12a-Mediated Gold Nanoparticle Aggregation for Colorimetric Detection of SARS-CoV-2. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 6871–6874, doi:10.1039/d1cc02546e.
54. Broughton, J.P.; Deng, X.; Yu, G.; Fasching, C.L.; Singh, J.; Streithorst, J.; Granados, A.; Sotomayor-Gonzalez, A.; Zorn, K.; Gopez, A.; et al. Rapid Detection of 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Using a CRISPR-Based DETECTR Lateral Flow Assay. *medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci.* **2020**, doi:10.1101/2020.03.06.20032334.
55. Zhang, Y.; Chen, M.; Liu, C.; Chen, J.; Luo, X.; Xue, Y.; Liang, Q.; Zhou, L.; Tao, Y.; Li, M.; et al. Sensitive and Rapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Using a Gold Nanoparticle-Based High-Throughput Platform Coupled with CRISPR/Cas12-Assisted RT-LAMP. *Sens. Actuators. B. Chem.* **2021**, *345*, doi:10.1016/J.SNB.2021.130411.
56. Agrawal, S.; Fanton, A.; Chandrasekaran, S.S.; Prywes, N.; Lukarska, M.; Biering, S.B.; Smock, D.C.J.; Mok, A.; Knott, G.J.; Van, E.; et al. Rapid Detection of SARS-CoV-2 with Cas13. *medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci.* **2020**, doi:10.1101/2020.12.14.20247874.

5 Conclusão

- A carragenana obtida da alga *G. skottsbergii* coletada na ecorregião subantártica chilena, tem potencial para ser utilizada, pois apresenta características químicas semelhantes à carragenana comercial do tipo kappa (Sigma®);
- Testes antioxidantes, como DPPH e ABTS, foram realizados para obter parâmetros de comparação entre a carragenina comercial (Sigma®) e a carragenana extraída da macroalga *G. skottsbergii*. Assim, juntamente com todos os resultados da caracterização, comprovou-se que o processo de purificação após a extração das macroalgas é semelhante à amostra comercial;
- As atividades antioxidantes frente aos ensaios de DPPH e ABTS apresentaram-se satisfatórias, visto que no método mais sensível (ABTS) todos os compostos apresentaram atividade semelhante ou maior do que à vitamina C. Moléculas antioxidantes eficientes que eliminam radicais ou neutralizam ROS podem prevenir ou melhorar os danos induzidos pelo estresse oxidativo. As atividades de antioxidantes contra vírus podem ser exploradas para tratar infecções virais humanas;
- Carragenana extraída da macroalga *G. skottsbergii* demonstrou a capacidade de se ligar a partículas virais de SARS-CoV-2 em um ambiente aquoso dentro de 24 horas de incubação;
- A carragenana extraída de *G. skottsbergii* foi utilizada como agente sequestrador de partículas virais. A carragenana extraída demonstrou sua capacidade de sequestrar partículas virais utilizando os ensaios RT-qPCR e RT-LAMP, que validou a taxa de ligação de 8,3%. Assim, fica claro que a carragenana derivada de macroalgas subantárticas tem usos promissores em aplicações diagnósticas e terapêuticas e em vários campos da biotecnologia.
- Estudos futuros são necessários para comparar a carragenana comercial (SIGMA®) e a carragenana da alga *G. skottsbergii* com diferentes concentrações para remoção do SARS-CoV-2, incluindo estudos para avaliar a presença de partículas virais e como ocorre a interação, com verificação de microscopia eletrônica (EM). Outra possibilidade é inibir a multiplicação viral na linhagem celular VERO E3, como

evidenciado pela ausência de citotoxicidade viral nas células. E avaliação com outras amostras virais, como por exemplo, o vírus herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 e 2), ou HIV entre outras formas virais para verificar a ação da carragenana.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S. et al. Marine fungi: An untapped bioresource for future cosmeceuticals. **Phytochemistry Letters**, v. 23, p. 15–20, 2018.
- AGRAWAL, S. et al. Rapid detection of SARS-CoV-2 with Cas13. **medRxiv**, 2020.
- ALEEM A; AKBAR SAMAD AB; VAQAR S. **Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)**. Disponível em: <https://www.statpearls.com/>. Acessado em: março de 2023.
- ALIPOOR, S. D. et al. COVID-19: Molecular and Cellular Response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–16, 2021.
- ÁLVAREZ-VIÑAS, M. et al. Antiviral Activity of Carrageenans and Processing Implications. **Marine Drugs**, v. 19, n. 8, p. 437, 2021.
- AOKI, M. N. et al. Colorimetric RT-LAMP SARS-CoV-2 diagnostic sensitivity relies on color interpretation and viral load. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9026, 2021.
- ARIEDE, M. B. et al. Cosmetic attributes of algae - A review. **Algal Research**, v. 25, p. 483–487, 2017.
- BABA, M. et al. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 11, p. 1742–1745, 1988.
- BARBOZA, V. DOS S. et al. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay as a rapid molecular diagnostic tool for COVID-19 in healthcare workers. **Journal of Clinical Virology Plus**, v. 3, n. 2, p. 100134, 2023.
- BERNEIRA, L. M. et al. Bioactivity and composition of lipophilic metabolites extracted from Antarctic macroalgae. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1275–1285, 2021.
- BORGES, A. A. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. Em: **Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**. EDUFBA, 2020.
- BOULHO, R. et al. Antiherpetic (HSV-1) activity of carrageenans from the red seaweed *Solieria chordalis* (Rhodophyta, Gigartinales) extracted by microwave-assisted extraction (MAE). **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 5, p. 2219–2228, 2017.
- BRASIL. **Painel Coronavírus**. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acessado em: março de 2023.
- BROUGHTON, J. P. et al. Rapid Detection of 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Using a CRISPR-based DETECTR Lateral Flow Assay. **medRxiv : the preprint server for health sciences**, p. 1–28, 27, 2020.

- BUSCHMANN, A. H. et al. Red algal farming in Chile: a review. **Aquaculture**, v. 194, n. 3–4, p. 203–220, 2001.
- BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 3004, 2020.
- CÁCERES, P. J. et al. Carrageenans from chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, v. 53, p. 81–86, 2000.
- CANDIDO, K. L. et al. Spike protein of SARS-CoV-2 variants: a brief review and practical implications. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1133–1157, 2022.
- CAO, Y. et al. CRISPR/Cas12a-mediated gold nanoparticle aggregation for colorimetric detection of SARS-CoV-2. **Chemical Communications**, v. 57, n. 56, p. 6871–6874, 2021.
- CARLUCCI, M. J. et al. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 20, n. 2, p. 97–105, 1997.
- CCDC. The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) — China, 2020. **China CDC Weekly**, p. 113–122, 2020.
- CERAR, J. Testing Classical Approach to Polymer Solutions on SAXS Data of λ -Carrageenan, κ -Carrageenan and Methylcellulose Systems. **Acta Chimica Slovenica**, v. 62, n. 3, p. 498–508, 2015.
- CERVEIRA, M. M. et al. Bioprospection of novel synthetic monocurcuminoids: Antioxidant, antimicrobial, and in vitro cytotoxic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111052, 2021.
- CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1161–1168, 2002.
- CHOI, G.; MOEHLING, T. J.; MEAGHER, R. J. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 23, n. 1, p. 9–28, 2023.
- CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, 2020.
- DA SILVA, S. J. R. et al. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 2319–2336, 2020.
- D'ARCHINO, R.; NELSON, W. A.; SUTHERLAND, J. E. Unnamed for over 30 years: *Gigartina falshawiae* sp. nov. (Gigartinaceae, Rhodophyta) and its confusion with *Iridaea tuberculosa* in New Zealand. **Phycologia**, v. 59, n. 1, p. 45–53, 2020.

DEMARCO, C. F. et al. New low-cost biofilters for SARS-CoV-2 using *Hymenachne grumosa* as a precursor. **Journal of Cleaner Production**, v. 331, p. 130000, 2022.

DIOGO, J. V. et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (*Gigartina skottsbergii*) against BoHV-1 and SuHV-1. **Research in Veterinary Science**, v. 98, p. 142–144, 2015.

DOS SANTOS, M. A. Z. et al. Rhodophyta, Ochrophyta and Chlorophyta macroalgae from different sub-Antarctic regions (Chile) and their potential for polyunsaturated fatty acids. **Brazilian Journal of Botany**, v. 44, n. 2, p. 429–438, 2021.

FLORES-VEGA, V. R. et al. **SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants**. **Viruses**MDPI, 2022.

FREITAS, A. R. R.; NAPIMOGA, M.; DONALISIO, M. R. Análise da gravidade da pandemia de Covid-19. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, n. 2, p. e2020119, 2020.

F-TISCHER, P. et al. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 4, p. 459–465, 2006.

GOMAA, H. H.; ELSHOUBAKY, G. A. Atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados carragena de algunsalgas marinhas. **Jornal Internacional de Revisão e Pesquisa Farmacêutica Atua**, v. 7, n. 1, p. 34–42, 2015.

GREEN, K. et al. What tests could potentially be used for the screening, diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages? **The Centre for Evidence-Based Medicine**, 2020.

GUAN, W. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020.

HEMMER, C. J.; LÖBERMANN, M.; REISINGER, E. C. COVID-19: Epidemiologie und Mutationen. **Der Radiologe**, v. 61, n. 10, p. 880–887, 2021.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 16, p. 7276–7280, 1991.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279–284, 2005.

HUGHEY, J. R. et al. *Sarcopeltis* gen. nov. (Gigartinaceae, Rhodophyta), with *S. skottsbergii* comb. nov. from southern South America and *S. antarctica* sp. nov. from the Antarctic Peninsula. **Phytotaxa**, v. 468, n. 1, p. 75–88, 2020.

IWASAKI, T.; WATARAI, S. Oral λ -carrageenan intake alleviates skin symptoms in a hapten induced atopic dermatitis-like model. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 82, n. 11, p. 1639–1642, 2020.

JANG, Y. et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan against influenza viruses and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 821, 2021.

JIANG, J.-L. et al. Insight on structure-property relationships of carrageenan from marine red algal: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 257, p. 117642, 2021.

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

KITAJIMA, H. et al. Clinical COVID-19 diagnostic methods: Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR). **Journal of Clinical Virology**, v. 139, p. 104813, 2021.

KWON, P. S. et al. Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, p. 50, 2020.

LOBREGAS, M. O. S.; BANTANG, J. P. O.; CAMACHO, D. H. Carrageenan-stabilized silver nanoparticle gel probe kit for colorimetric sensing of mercury (II) using digital image analysis. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 26, p. 100303, 2019.

MACIEL, O. M. C. et al. Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphoxylon stygium*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 316–322, 2018.

MAGLARAS, P. et al. A Molecular Lateral Flow Assay for SARS-CoV-2 Quantitative Detection. **Biosensors**, v. 12, n. 11, p. 926, 2022.

MANDAL, N. et al. Correlation between CNS Tuberculosis and the COVID-19 Pandemic: The Neurological and Therapeutic Insights. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 18, p. 2789–2792, 2020.

MARTIN, A. H. et al. Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 6, p. 817–824, 2006.

MARTINY, T. R. et al. A novel biodegradable film based on κ -carrageenan activated with olive leaves extract. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 7, p. 3147–3156, 2020.

MAUTNER, L. et al. Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 160, 2020.

MINAMI, K. et al. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA quantification by RT-LAMP compared to RT-qPCR. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 27, n. 7, p. 1068–1071, 2021.

MOHAMADIAN, M. et al. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. **The Journal of Gene Medicine**, v. 23, n. 2, 2021.

MOREIRA, R. DA S. Análises de classes latentes dos sintomas relacionados à COVID-19 no Brasil: resultados da PNAD-COVID19. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, 2021.

MOROKUTTI-KURZ, M. et al. Iota-carrageenan neutralizes SARS-CoV-2 and inhibits viral replication in vitro. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0237480, 2021.

MUTESA, L. et al. A pooled testing strategy for identifying SARS-CoV-2 at low prevalence. **Nature**, v. 589, n. 7841, p. 276–280, 2021.

MUTHULAKSHMI, L. et al. A novel Ag/carrageenan–gelatin hybrid hydrogel nanocomposite and its biological applications: Preparation and characterization. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 115, p. 104257, 2021.

NAVIKAITE, V. et al. Interaction between κ - and ι -carrageenan and anthocyanins from *Vaccinium myrtillus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 36–44, 2016.

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

NETO, A. M.; FREIRE, L. L. Importância dos laboratórios de análises clínicas no cenário da pandemia do novo Coronavírus. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 24, p. 51–60, 2020.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 63e–663, 2000.

ÖZKAN OKTAY, E. et al. An update comprehensive review on the status of COVID-19: vaccines, drugs, variants and neurological symptoms. **TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY**, v. 45, n. SI-1, p. 342–357, 2021.

PACHECO-QUITO, E.-M.; RUIZ-CARO, R.; VEIGA, M.-D. Carrageenan: Drug Delivery Systems and Other Biomedical Applications. **Marine Drugs**, v. 18, n. 11, p. 583, 2020.

PANDEY, S.; GOSWAMI, G. K.; NANDA, K. K. Green synthesis of biopolymer–silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 583–589, 2012.

PANGESTUTI, R.; SIAHAAN, E.; KIM, S.-K. Photoprotective Substances Derived from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 16, n. 11, p. 399, 2018.

PARK, G.-S. et al. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 22, n. 6, p. 729–735, 2020.

ANA, P. et al. Anti-Herpes simplex virus (HSV-1) activity and antioxidant capacity of carrageenan-rich enzymatic extracts from *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 322–330, 2021.

PEREIRA, L. et al. Use of FTIR, FT-Raman and ^{13}C -NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 223–228, 2003.

PEREIRA, L. et al. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1903–1909, 2009.

PEREIRA, L. Seaweeds as Source of Bioactive Substances and Skin Care Therapy—Cosmeceuticals, Algoteraphy, and Thalassotherapy. **Cosmetics**, v. 5, n. 4, p. 68, 2018.

PEREIRA, L.; CRITCHLEY, A. T. The COVID 19 novel coronavirus pandemic 2020: seaweeds to the rescue? Why does substantial, supporting research about the antiviral properties of seaweed polysaccharides seem to go unrecognized by the pharmaceutical community in these desperate times? **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 3, p. 1875–1877, 2020.

PILLAY, T. S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. **Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 7, p. 366–369, 2020.

POKHREL, P.; HU, C.; MAO, H. Detecting the Coronavirus (COVID-19). **ACS Sensors**, v. 5, n. 8, p. 2283–2296, 2020.

RE, R. et al. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RHIM, J.-W.; WANG, L.-F. Preparation and characterization of carrageenan-based nanocomposite films reinforced with clay mineral and silver nanoparticles. **Applied Clay Science**, v. 97–98, p. 174–181, 2014.

RIOUX, L.-E.; TURGEON, S. L. Seaweed carbohydrates. Em: **Seaweed Sustainability**. Elsevier, 2015. p. 141–192.

RODRIGUES, D. et al. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. **Food Chemistry**, v. 183, p. 197–207, 2015.

SAHOO, P. et al. Optimization of pH-responsive carboxymethylated iota - carrageenan/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery using response surface methodology. **Reactive and Functional Polymers**, v. 119, p. 145–155, 2017.

SAMUDRALA, P. K. et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **European Journal of Pharmacology**, v. 883, p. 173375, 2020.

SCHOELER, G. P. et al. SARS-CoV-2 removal with a polyurethane foam composite. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 8, p. 22024–22032, 2022.

SCHÜTZ, D. et al. Carrageenan-containing over-the-counter nasal and oral sprays inhibit SARS-CoV-2 infection of airway epithelial cultures. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 320, n. 5, p. L750–L756, 2021.

- ŞEN, M.; ERBOZ, E. N. Determination of critical gelation conditions of κ -carrageenan by viscosimetric and FT-IR analyses. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1361–1364, 2010.
- SHI, Q. et al. Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 453–454, p. 1–9, 2017.
- ŠIMKOVIC, I. et al. Extraction and characterization of polysaccharide films prepared from *Furcellaria lumbricalis* and *Gigartina skottsbergii* seaweeds. **Cellulose**, v. 28, n. 15, p. 9567–9588, 2021.
- SOARES DA SILVA, M. et al. Brief dispersion of a putative B.1.1.28-derived SARS-CoV-2 lineage harboring additional N234P and E471Q spike protein mutations in individuals crossing the Argentina-Brazil border. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 49, p. 102390, 2022.
- SONG, S. et al. Inhibitory activities of marine sulfated polysaccharides against SARS-CoV-2. **Food & Function**, v. 11, n. 9, p. 7415–7420, 2020.
- SUGANYA, A. M. et al. Pharmacological importance of sulphated polysaccharide carrageenan from red seaweed *Kappaphycus alvarezii* in comparison with commercial carrageenan. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1300–1312, 2016.
- SUSANO, P. et al. Unravelling the Dermatological Potential of the Brown Seaweed *Carpomitra costata*. **Marine Drugs**, v. 19, n. 3, p. 135, 2021.
- TALWAR, C. S. et al. Detection of Infectious Viruses Using CRISPR-Cas12-Based Assay. **Biosensors**, v. 11, n. 9, p. 301, 2021.
- DAO THI, V. L. et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 556, p. 7075, 2020.
- TRASSANTE, C. M. et al. Detection of SARS-CoV-2 virus using an alternative molecular method and evaluation of biochemical, hematological, inflammatory, and oxidative stress in healthcare professionals. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 104975, 2021.
- UDUGAMA, B. et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. **ACS Nano**, v. 14, n. 4, p. 3822–3835, 2020.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. DO C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139–145, 2004.
- WEBBER, V. et al. Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 812–818, 2012.
- WESTERMEIER, R. et al. Seasonal variation of carrageenan yield, gel strength and viscosity in *Sarcopeltis ex Gigartina skottsbergii* from Southern Chile. **Phycological Research**, v. 70, n. 1, p. 42–49, 2022.

WHO. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020.**

WHO. **Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Updates and Monthly Operational Updates.** Acessado em: março de 2023.

WHO. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.** Acessado em: março de 2023.

WIGGINTON, K. R.; KOHN, T. Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 84–89, 2012.

XI, J. et al. Nasally inhaled therapeutics and vaccination for COVID-19: Developments and challenges. **MedComm**, v. 2, n. 4, p. 569–586, 2021.

YAMADA, T. et al. Preparation of O-acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti-HIV activity and low anticoagulant effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 2, p. 115–120, 2000.

YERMAK, I. M. et al. Effects of structural peculiarities of carrageenans on their immunomodulatory and anticoagulant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 713–720, 2012.

YU, J. et al. Recent Understandings Toward Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): From Bench to Bedside. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.

YUAN, H. et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of κ-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 685–692, 2005.

ZHANG, Y. et al. Sensitive and rapid on-site detection of SARS-CoV-2 using a gold nanoparticle-based high-throughput platform coupled with CRISPR/Cas12-assisted RT-LAMP. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 345, p. 130411, 2021.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

ZIA, K. M. et al. **A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites.** **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 282-301, 2017.

ANEXO

Anexo A – Comprovante do certificado de aceite da revista *Biosensors*



Article

Carrageenan from *Gigartina skottsbergii*: A Novel Molecular Probe to Detect SARS-CoV-2

Patrícia Daiane Zank ¹, Milena Mattes Cerveira ¹, Victor Barboza dos Santos ¹, Vitor Pereira Klein ¹, Thobias Toniolo de Souza ¹, Danielle Tapia Bueno ², Tais Poletti ², Amanda Fonseca Leitzke ², Janice Luehring Giongo ¹, Neftali Lenin Villarreal Carreño ³, Andrés Mansilla ⁴, Maria Soledad Astorga-España ⁵, Claudio Martin Pereira de Pereira ^{1,*} and Rodrigo de Almeida Vaucher ^{1,*}

¹ Department of Chemical, Pharmaceutical, and Food Sciences, Microorganism Biochemistry and Molecular Biology Research Laboratory, (LAPEBBIOM), Federal University of Pelotas, Pelotas 96010-610, RS, Brazil

² Department of Chemical, Pharmaceutical, and Food Sciences, Laboratory for Lipidomic and Bio-Organic Research, Bioforensic Research Group, Federal University of Pelotas, Pelotas 96010-610, RS, Brazil

³ Materials Science and Engineering Graduate Program, Technology Development Center, Novonano Laboratory, Federal University of Pelotas, Pelotas 96010-610, RS, Brazil

⁴ Antarctic and Subantarctic Macroalgae Laboratory, Universidad de Magallanes, Punta Arenas 01855, Chile

⁵ Department of Science and Natural Resources, Magallanes Region and Chilean Antarctic, University of Magallanes, Punta Arenas 01855, Chile

* Correspondence: claudiochemistry@gmail.com (C.M.P.d.P.); rodvaucher@hotmail.com (R.d.A.V.)