

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SILIANE DENISE BERTÉ

**HETERORAMNANAS SULFATADAS NATIVAS E MODIFICADAS
QUIMICAMENTE OBTIDAS DA MACROALGA VERDE *Gayralia
brasiliensis*: ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

CURITIBA

2013

SILIANE DENISE BERTÉ

**HETERORAMNANAS SULFATADAS NATIVAS E MODIFICADAS
QUIMICAMENTE OBTIDAS DA MACROALGA VERDE *Gayralia
brasiliensis*: ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Engenharia De Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Duarte Nosedá

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2013

RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Universidade Federal do Paraná
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Processos
Biotecnológicos


Aos vinte e quatro dias do mês de maio de 2013, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Octuagésima Segunda Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Agroindústria e Biocombustíveis e Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos Professores Doutores Maria Teresa Villela Romanos (UFRJ), Diogo Ricardo Bazan Ducatti (UFPR), Claudia Feijó Ortolani-Machado (UFPR), Vanete Thomaz Soccol (UFPR), e Maria Eugênia Duarte Nosedá (UFPR - orientadora da tese).

Às 14h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Siliane Denise Berté** a fazer a apresentação da Tese intitulada: "**Heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas quimicamente obtidas da macroalga verde *Gayralia brasiliensis*: Estrutura química e atividades biológicas**". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores Drª Maria Teresa Villela Romanos, Dr Diogo Ricardo Bazan Ducatti, Drª Claudia Feijó Ortolani-Machado, Drª Vanete Thomaz Soccol e Drª Maria Eugênia Duarte Nosedá declarou a candidata aprovada (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

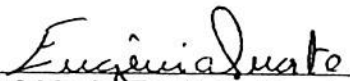
Curitiba, 24 de maio de 2013


Profª Drª Maria Teresa Villela Romanos


Prof Dr Diogo Ricardo Bazan Ducatti


Profª Drª Claudia Feijó Ortolani-Machado


Profª Drª Vanete Thomaz Soccol


Profª Drª Maria Eugênia Duarte Nosedá

Dedico este trabalho aos meus pais José e
Loiri pelo amor incondicional

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

À professora Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá pela oportunidade de orientação, por todos os conhecimentos transmitidos durante estes quatro anos de trabalho, pelo apoio, pela dedicação e principalmente, pela paciência e confiança.

Ao professor Dr. Miguel Daniel Nosedá pela co-orientação, pela imensa ajuda, que foi indispensável para conclusão do projeto.

À professora Dr^a. Claudia Feijó Ortolani-Machado (Departamento de Biologia Celular-UFPR) pelas sugestões, pelo incentivo e pela doação dos ovos fertilizados, possibilitando o desenvolvimento do trabalho com os embriões de galinha.

À minha família, meus queridos pais José e Loiri, e meus irmãos Miriam e Juliano, onde encontro diariamente meu conforto espiritual e minha segurança para viver.

À professora Dr^a Sheila Maria Brochado Winnischofer (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-UFPR), pela colaboração referente aos ensaios de atividade antitumoral.

À professora Maria Teresa Villela Romanos (LEDAC/UFRJ) pela colaboração, possibilitando assim a realização dos ensaios de atividade antiviral.

Aos meus amigos Alfredo, Brique (Felipe) e Rodrigo pelos melhores momentos durante estes quatro anos, pelos “baygons PA” e por estarem comigo quando eu realmente precisei. Obrigada gentchy!!!

À once (Denise Salmon) e à Anna pela amizade incomparável, pelas conversas matinais e por fazerem parte da minha vida. Eu adoro as duas!

À Juliane, Rodrigo e à Camila pelo acolhimento. Meus primeiros amigos em Curitiba.

À pessoa que me segue desde Londrina, Giovana, por entender todos os meus momentos de dificuldade e por ouvir todas as minhas reclamações DAÍ.

À Mariana, pela amizade e pela ajuda com ensaios de atividade antitumoral.

Ao CassiJones (Cassiano) e à camponese (Pauline) pelos almoços, risadas, saídas e pela amizade verdadeira. Ao Cassiano pela ajuda com o francês, com os programas de computador, por todas as dúvidas tiradas no laboratório, e pela possibilidade de ter como amigo alguém tão coerente e tão inteligente. À Pauline pelos finais de semana na praia, pelas comidas e pela companhia que fez toda diferença nestes últimos três anos. À vocês, meu muito obrigada!

Às minhas eternas amigas Sandra, Naissara e Liziane pela amizade que é fortalecida com o passar do tempo.

Ao meu namorado Neiton pelo amor, segurança, proteção e principalmente, pela paciência nestes últimos meses. Você faz parte da minha vida e te agradeço imensamente.

Ao pessoal das baladas e dos finais de semana: Heder, Lucas, Zezé, Mari, Kaká, Cátia, Ana, Kiko e em especial à Marcela, pelas longas caminhadas, risadas e conversas intermináveis, mas de muito proveito.

À Juliana Cassolato, por ter iniciado os trabalhos com o gênero *Gayralia*, facilitando assim a compreensão e a redação do meu trabalho.

À Juliana Ropelatto, à Rosecler e ao Cristiano pelo coleguismo e pela convivência agradável, vocês são inesquecíveis.

À minha IC Thais pela dedicação e imensa ajuda.

A Lu pelas saídas, pelas risadas e por todas as dúvidas tiradas no laboratório.

Ao Diegão pela amizade, pelas “reclamações” e pelas conversas sobre a vida.

Ao meu sobrinho Chico, que faz parte da minha vida.

Ao Luciano pelas risadas, pelo bom humor e por todas as vezes em que me ajudou com equipamentos e técnicas de laboratório, principalmente em relação aos trabalhos de atividade biológica.

Ao pessoal do Lab Anexo E2, Robertinho pelas risadas e pela ajuda com o pc e à Marina pelas palavras de conforto.

À Elisângela e à Rosane pelas análises de HPSEC e CG-EM.

À Jennifer pela ajuda com a correção e com a redação das patentes.

Ao pessoal do laboratório: Tati W., Tati M., Djuna, Estér, Gilda e Fran pela descontração e pela ajuda no dia a dia do laboratório.

À professora Dra. Franciane Pellizzari (UNESPAR) pelas algas gentilmente cedidas.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia por possibilitar a conclusão deste curso de doutorado.

Ao Centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR pelas análises de RMN.

Ao programa REUNI, à CAPES e ao PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

Agradeço também a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho e participaram da minha vida durante estes quatro anos.

Muito obrigada!

“Seja em você a mudança que quer para o mundo”

(Gandhi)

RESUMO

Macroalgas verdes marinhas (Chlorophyta) sintetizam polissacarídeos sulfatados com uma grande variabilidade estrutural. Alguns destes polímeros apresentam atividades biológicas, como atividade antiangiogênica, antitumoral, antiviral e anticoagulante. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar estruturalmente os polissacarídeos obtidos da clorófito *Gayralia brasiliensis* e avaliar sua bioatividade frente aos ensaios de vasculogênese, angiogênese, antitumoral, anticoagulante e antiviral. A alga seca e moída foi submetida sequencialmente à extração aquosa a 25 e 80 °C (4 vezes). Os extratos obtidos a 80 °C foram reunidos originando fração GB. A purificação de GB foi conduzida por ultrafiltração em membrana (*cut-off* 300 kDa) obtendo-se uma fração retida (GBH, 72% de rendimento) e outra eluída (GBE, 28,0% de rendimento). GBH (29,1% de grupos O-sulfato), apresenta uma massa molar de 2.100 kDa (HPSEC-MALLS-RI) e é constituída majoritariamente por unidades de α -L-ramnose (64,0%) e menores proporções de glucose (14,5%), xilose (14,7%) e galactose (6,7%). Adicionalmente GBH contém ácidos urônicos (9,1%). A identificação dos ácidos urônicos realizada após carboxi-redução de GBH e análise por GC-MS na forma de acetatos de alditóis demonstrou a presença de ácido glucurônico e galacturônico (3,2% e 3,7%, respectivamente). Análises químicas e espectroscópicas conduzidas com a heteroramnana sulfatada GBH demonstraram a presença de unidade de ramnose 3-ligadas, as quais estão parcialmente substituídas por grupos sulfato em C-4, C-2 e/ou em ambos carbonos C-2 e C-4. Unidades de ramnose 4-, 3- e/ou dissulfatadas (3,4 sulfato) também são constituintes de GBH. Adicionalmente, unidades de ramnose 2,3-substituídas representam pontos de ramificação do polímero. Ácidos urônicos estão presentes principalmente como unidades 2-, 4- e 2,4-ligadas. Análises por RMN mono- e bidimensionais de GBH confirmam a presença de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, 3- e 2-ligadas. A integração dos prótons anoméricos das unidades de ramnose de GBH carboxi-reduzida e dessulfatada mostrou uma proporção molar de 0,26:1,0:0,51 para as unidades de 2,3-dissubstituídas, 3- e 2-ligadas, respectivamente. Utilizando a degradação controlada de Smith a partir de GBH foi possível obter uma heteroramnana modificada quimicamente (GBH-S) com elevados teores de grupos sulfato (38,2%) e ramnose (78,2%). As heteroramnanas sulfatadas GB, GBH e GBH-S apresentaram potente atividade antivasculogênica na membrana da vesícula vitelínica de embriões de galinha, sendo a heteroramnana modificada GBHS a que apresentou maior atividade. Na concentração de 320 μ g GBH-S ocasionou 100% de inibição da vascularização, enquanto que GB e GBH nesta mesma concentração inibiram 94,2 e 86,9%, respectivamente. Em relação à atividade antiangiogênica em membrana corioalantóica destes embriões, concentrações de 480 e 320 μ g das frações GB e GBH-S inibiram 100% da vascularização. As frações GBH e GBH-S (500 μ g.mL⁻¹) diminuíram significativamente a viabilidade das células tumorais cerebrais (glioma humano, linhagem U87MG) no tempo de 48 horas em 54,9% e 69%, respectivamente. Adicionalmente, estes polissacarídeos apresentaram atividade anticoagulante *in vitro* através dos testes de TTPA, TT e TP e atividade anti-herpética frente aos vírus herpes simplex (HSV) tipos 1 e 2. Desta forma, as heteroramnanas sulfatadas sintetizadas por *G. brasiliensis* apresentam uso potencial na área biomédica como agentes antiangiogênico, antitumoral, anticoagulante e antiviral.

Palavras-chave: *G. brasiliensis*, ramnana sulfatada, atividade antiangiogênica

ABSTRACT

Marine green macroalgae (Chlorophyta) synthesize sulfated polysaccharides with great structural variability. Some of these polysaccharides show biological activities, such as antiangiogenic, antitumor, antiviral and anticoagulant. Thus, the aim of this work was to characterize the structure of the polysaccharides from *Gayralia brasiliensis* (Chlorophyta) and evaluate its activity in the vasculogenesis, angiogenesis, antitumor, anticoagulant and antiviral assays. The dry, ground alga underwent sequential aqueous extractions at 25 °C and 80 °C (4 times). The extracts obtained at 80 °C were pooled, yielding the fraction GB. Purification of GB was carried out by ultrafiltration in 300 kDa molecular weight cut-off membrane, producing a retained (GBH, 72% yield) and an eluted (GBE, 28.0% yield) fraction. GBH (29.1% O-sulfate groups) has a molecular weight of 2,100 kDa (HPSEC-MALLS-RI) and is predominantly comprised of α -L-rhamnose (64.0%) with lesser amounts of glucose (14.5%), xylose (14.7%) and galactose (6.7%). In addition, GBH contains uronic acids (9.1%). Identification of uronic acids following carboxy-reduction of GBH and GC-MS analysis in the form of alditol acetates showed the presence of glucuronic and galacturonic acids (3.2% and 3.7%, respectively). Chemical and spectroscopic analyses carried out in the sulfated heterorhamnan GBH revealed the presence of 3-linked rhamnose units, which are partially substituted by sulfate groups in C-4, C-2 and/or both C-2 and C-4 carbon atoms. Sulfate-substituted rhamnose units in the positions 4-, 3- and/or 3,4-disulfate are likewise found in GBH. Moreover, 2,3-substituted rhamnose units are the branching points of the polymer chain. Uronic acids are present mainly as 2-, 4- and 2,4-linked units. Mono- and bidimensional NMR analyses of GBH confirmed the presence of 2,3-disubstituted, 3- and 2-linked rhamnose units. Integration of the anomeric protons of rhamnose in carboxy-reduced, desulfated GBH showed a molar ratio of 0.26:1.0:0.51 for 2,3-disubstituted, 3- and 2-linked units, respectively. Controlled Smith degradation of GBH yielded a chemically-modified heterorhamnan (GBH-S) with high amounts of sulfate (38.2%) and rhamnose (78.2%). Sulfated heterorhamnans GB, GBH and GBH-S showed marked antivasculogenetic activity in the yolk sac membrane of chicken embryos, and the modified heterorhamnan (GBH-S) was the sample with highest activity. At the dose of 320 μ g, GBH-S caused complete inhibition of vascularization, whereas GB and GBH inhibited 94.2 and 86.9% at the same dose, respectively. In the antiangiogenic assay in the chorioallantoic membrane of these embryos, doses of 480 and 320 μ g of fractions GB and GBH-S inhibited 100% of vascularization. Fractions GBH and GBH-S (500 μ g.mL⁻¹) decreased significantly the viability of brain tumor cells (human glioma, lineage U87MG) after 48 hours, in 54.9 and 69%, respectively. In addition, these polysaccharides showed *in vitro* anticoagulant activity in the TTPA, TT and TP assays, as well as antiviral activity against herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2. Hence, sulfated heterorhamnans produced by *G. brasiliensis* have potential use in biomedical sciences as antiangiogenic, antitumor, anticoagulant and antiviral agents.

Key words: *G. brasiliensis*, sulfated rhamnan, antiangiogenic activity

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA DE <i>G. oxysperma</i> | 33 |
| FIGURA 2 - ASPECTO GERAL DA CLÓROFITA <i>G. brasiliensis</i> | 36 |
| FIGURA 3 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA MACROALGA VERDE <i>G. brasiliensis</i> | 49 |
| FIGURA 4 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES BRUTAS Gba, Gb3, Gb4, Gb5 E Gb6..... | 52 |
| FIGURA 5 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES BRUTAS Gba (a), Gb3 (b), Gb4 (c), Gb5 (d) e Gb6 (f)..... | 54 |
| FIGURA 6 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO REUNIDA (GB)..... | 55 |
| FIGURA 7 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO RETIDA NA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO DE 300 kDa (GBH)..... | 57 |
| FIGURA 8 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO ELUÍDA NA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO DE 300 kDa (GBE)..... | 57 |
| FIGURA 9 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE CARBOXI-REDUÇÃO DO ÁCIDO GLUCURÔNICO COM NaBH ₄ E NaBD ₄ | 61 |
| FIGURA 10 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES GBH-RD (a), GBH (b) e GB (c)..... | 65 |
| FIGURA 11 - ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DAS FRAÇÕES GBH-RD (a), GBH (b) e GB (c)..... | 67 |
| FIGURA 12 - ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES GBH (a e c) e GBH-RD (b e d). REGIÃO DO ANEL (a e b) E REGIÃO ANOMÉRICA (c e d)..... | 69 |
| FIGURA 13 - PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA FRAÇÃO HOMOGÊNEA CARBOXI-REDUZIDA E DESSULFATADA (GBH-RD)..... | 70 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 14 - ESTRUTURA TEÓRICA DE HETERORAMNANA SULFATADA ANTES (a) E APÓS DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (b)..... | 76 |
| FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (GBH-S)..... | 78 |
| FIGURA 16- COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES GBH E DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (GBH-S)..... | 78 |
| FIGURA 17 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GBH-S (a), GBH (b) DAS REGIÕES ANOMÉRICA E DO ANEL..... | 80 |
| FIGURA 18 - ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO GBH-S EM CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA..... | 82 |
| FIGURA 19- PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES GBH-S2, GBH-S3, GBH-S4 E GBH-S5..... | 83 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|-----|
| FIGURA 20 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DO SISTEMA VASCULAR..... | 90 |
| FIGURA 21 - PROCESSO DE ANGIOGÊNESE NO CRESCIMENTO DE TUMORES..... | 94 |
| FIGURA 22 - FOTOGRAFIA DE UM EMBRIÃO DE 2 DIAS DE DESENVOLVIMENTO..... | 99 |
| FIGURA 23 - FOTOGRAFIA DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE UM EMBRIÃO DE 6 DIAS DE DESENVOLVIMENTO..... | 100 |
| FIGURA 24 - FOTO DA LINHAGEM U87MG DE GLIOBASTOMA HUMANO... | 104 |
| FIGURA 25 - ESQUEMA GERAL DA METODOLOGIA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES GB, GBH E GBH-S EM RELAÇÃO A MODULAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO EM EMBRIÕES DE GALINHA..... | 112 |
| FIGURA 26 - ESQUEMA DE FOTOGRAFIAS DEMONSTRANDO A METODOLOGIA DE ENSAIO DA VASCULOGÊNESE EM MEMBRANA DA VESÍCULA VITELÍNICA DE EMBRIÕES DE <i>G. domesticus</i> | 115 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 27 - ESQUEMA DE FOTOGRAFIAS DEMONSTRANDO A METODOLOGIA DE ENSAIO DA ANGIOGÊNESE EM MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÕES DE <i>G. domesticus</i> | 118 |
| FIGURA 28 - NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE <i>G. domesticus</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GB, Controle positivo: HP (80 µg) e controle negativo: FGFb (50 ng.mL ⁻¹)..... | 130 |
| FIGURA 29 - NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE <i>G. domesticus</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GBH, Controle positivo: HP (80 µg) e controle negativo: FGFb (50 ng.mL ⁻¹)..... | 132 |
| FIGURA 30 - NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE <i>G. domesticus</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GBH-S, Controle positivo: HP (80 µg) e controle negativo: FGFb (50 ng.mL ⁻¹)..... | 133 |
| FIGURA 31 - FOTOGRAFIAS DOS VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE EMBRIÕES DE <i>G. domesticus</i> COM QUATRO DIAS DE DESENVOLVIMENTO..... | 135 |
| FIGURA 32 - NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE EMBRIÕES DE <i>G. domesticus</i> DEMONSTRANDO O EFEITO DAS FRAÇÕES GB, GBH E GBH-S SOBRE FGFb..... | 137 |
| FIGURA 33 - NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MC DE EMBRIÕES DE <i>G. domesticus</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GB e GBH-S, Controle positivo: HP (80 µg) e controle negativo: FGFb (50 ng.mL ⁻¹)..... | 140 |
| FIGURA 34 - FOTOGRAFIAS DE EMBRIÕES E DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE <i>G. domesticus</i> DE OITO DIAS DE DESENVOLVIMENTO..... | 142 |
| FIGURA 35 - MICROFOTOGRAFIAS DOS VASOS SANGUÍNEOS DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE <i>G. domesticus</i> DE OITO DIAS DE DESENVOLVIMENTO..... | 143 |
| FIGURA 36 - NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MC DE EMBRIÕES DE <i>G. domesticus</i> DEMONSTRANDO O EFEITO DA FRAÇÃO GBH-S SOBRE FGFb..... | 144 |
| FIGURA 37 - VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES GBH E GBH-S..... | 149 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 38 - TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (TTPA) PARA AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS GB, GBH E GBHS OBTIDAS DE <i>G. brasiliensis</i> | 154 |
| FIGURA 39 - TEMPO DE TROMBINA (TT) PARA AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS GB, GBH E GBHS OBTIDAS DE <i>G. brasiliensis</i> | 155 |
| FIGURA 40 - TEMPO DE PROTROMBINA (TP) PARA AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS GB, GBH E GBHS OBTIDAS DE <i>G. brasiliensis</i> | 157 |
| FIGURA 41 - MECANISMO DE AÇÃO ANTIVIRAL DA FRAÇÃO GB OBTIDA DE <i>G. brasiliensis</i> MEDIANTE AOS VÍRUS HSV-1 E HSV-2..... | 162 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

| | | |
|-------------|---|----|
| TABELA 1 - | RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE <i>G. brasiliensis</i> | 50 |
| TABELA 2 - | MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE <i>G. brasiliensis</i> | 51 |
| TABELA 3 - | RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO BRUTA GB..... | 55 |
| TABELA 4 - | RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES GB, GBH e GBE..... | 58 |
| TABELA 5 - | MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES GB, GBH e GBE..... | 59 |
| TABELA 6 - | RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES GB, GBH, GBH-R E GBH-RD..... | 62 |
| TABELA 7 - | MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES GB, GBH, GBH-R E GBH-RD..... | 62 |
| TABELA 8 - | DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DA FRAÇÃO HOMOGÊNEA CARBOXI-REDUZIDA DESSULFATADA GBH-RD..... | 73 |
| TABELA 9 - | ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO GBH-R..... | 74 |
| TABELA 10 - | ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (GBH-S) E FRAÇÃO GBH..... | 79 |
| TABELA 11 - | RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO GBH-S..... | 85 |

CAPÍTULO II

| | | |
|-------------|---|-----|
| TABELA 12 - | COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, TEOR E POSIÇÃO DOS GRUPOS SULFATO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES MARINHAS (<i>Chlorophyta</i>)..... | 108 |
|-------------|---|-----|

| | |
|---|-----|
| TABELA 13 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, TEOR DE GRUPOS SULFATO E ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA (HSV-1 E HSV-2) DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES MARINHAS (<i>Chlorophyta</i>)..... | 111 |
| TABELA 14 - ATIVIDADE ANTIVASCULOGÊNICA DAS FRAÇÕES GB, GBH E GBH-S ISOLADAS DE <i>G. brasiliensis</i> SOBRE A MEMBRANA DA VESÍCULA VITELÍNICA DE EMBRIÕES DE GALINHA..... | 129 |
| TABELA 15 - ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DAS FRAÇÕES GB E GBH-S ISOLADAS DE <i>G. brasiliensis</i> SOBRE A MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÕES DE GALINHA..... | 139 |
| TABELA 16 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE POR TTPA, TT E PT DAS FRAÇÕES GB, GBH E GBH-S ISOLADAS DE <i>G. brasiliensis</i> | 152 |
| TABELA 17 - CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DA FRAÇÃO BRUTA GB OBTIDA DE <i>G. brasiliensis</i> | 160 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $[\alpha]_D^{25}$ – rotação óptica específica (a 25 °C)
- BaCl₂** – cloreto de bário
- BaSO₄** – sulfato de bário
- BSA** – soro albumina bovina
- Cam-assay** – *chorioallantoic membrane assay*
- CC₅₀** – Concentração citotóxica 50%
- CH₃** – grupo metil
- CLG-EM** – cromatografia líquida gasosa acoplada à espectrometria de massa
- CMC** – 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida
- CMNT** – concentrações máximas não tóxicas
- D₂O** – água deuterada
- dn/dc** – variação do índice de refração em relação a concentração
- DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- EGF** – *endothelial growth factor*
- FGF** – *fibroblast growth factor*
- FGFb** – *fibroblast growth factor-basic*
- FGFR** – fibroblast growth factor receptors
- FID** – detector de ionização de chama
- GAG** – glicosaminoglicanos
- HBSS** – solução salina balanceada de Hank
- HPSEC-MALLS-RI** – cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz
- HSQC** – *heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*
- HSV-1** – vírus herpes simplex tipo 1
- HSV-2** – vírus herpes simplex tipo 2
- HVEM** – *herpes virus entry mediators*
- IS** – Índice de seletividade (CC₅₀/CI₅₀)
- CI₅₀** – concentração inibitória 50%
- ICH₃** – iodometano
- IR** – índice de refração

- m/v*** – relação entre massa e volume
- m/z*** – relação entre massa e carga
- m-NaIO₄*** – metaperiodato de sódio
- MC** – membrana corioalantóica
- MEM** – meio essencial mínimo
- MMPs** – metaloproteinases de matriz
- MTT** – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- MV** – membrana vitelínica
- Mw** – massa molecular ponderal média
- NaBD₄** – borodeutério de sódio
- NaBH₄** – borohidreto de sódio
- NaNO₃** – nitrito de sódio
- NaOH** – hidróxido de sódio
- ppm** – partes por milhão
- PI** – Percentagem de inibição
- PCR** – Polymerase chain reaction
- PS** – polissacarídeos sulfatados
- PBS** – tampão fosfato salino
- TIMPs** – *tissue inhibitors of metaloproteinases*
- RMN ¹³C** – ressonância magnética nuclear Carbono 13
- RMN ¹H** – ressonância magnética nuclear Hidrogênio
- SFB** – soro fetal bovino
- SO₃Na** – sulfato de sódio
- TFA** – ácido trifluoracético
- TGF-β** – *transforming growth factor-beta*
- TNR** – terminal não redutor da cadeia polissacarídica
- TTPA** – tempo de tromboplastina parcial ativada
- TT** – tempo de trombina
- TP** – tempo de protrombina
- v/v** – relação entre volume e volume
- VEGF** – *vascular endothelial growth factor*
-
- Gb1 e Gb2** – frações brutas obtidas por extração a 25 °C
- Gb3 – Gb6** – frações brutas obtidas por extrações a 80 °C

Gba – fração bruta obtida pela união de Gb1 e Gb2

GB – fração bruta obtida pela união de Gb3 – Gb6

GB1 – GB7 – frações eluídas em cromatografia de troca iônica a partir de GB

GBH – fração homogênea obtida por ultrafiltração

GBE – fração eluída obtida por ultrafiltração

GBH-R – fração GBH carboxi-reduzida

GBH-RD – fração GBH-R dessulfatada

GBH-S – fração obtida por degradação controlada de Smith

GBH-S1 – GBH-S5 – frações eluídas em cromatografia de troca iônica a partir de GBH-S

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 23 |
| CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA MACROALGA VERDE MARINHA <i>Gayralia brasiliensis</i>..... | 25 |
| 2. OBJETIVOS..... | 25 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 25 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 26 |
| 3.1. ALGAS MARINHAS..... | 26 |
| 3.1.1. Algas verdes..... | 27 |
| 3.2. GÊNERO <i>Gayralia</i> | 28 |
| 3.3. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS..... | 30 |
| 3.3.1. Distribuição dos polissacarídeos sulfatados na natureza..... | 30 |
| 3.3.2. Composição química e estrutura dos polissacarídeos presentes no gênero <i>Gayralia</i>..... | 32 |
| 3.3.3. Produtos de degradação controlada de Smith obtidos de polissacarídeos sulfatados de <i>Gayralia</i>..... | 34 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 4.1. ESPÉCIE <i>G. brasiliensis</i> E SEU POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO..... | 36 |
| 4.2. COLETA E PROCESSAMENTO..... | 37 |
| 4.3. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA <i>G. brasiliensis</i> | 37 |
| 4.4. ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA..... | 38 |
| 4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS..... | 38 |
| 4.5.1. Carboidratos totais..... | 38 |
| 4.5.2. Proteínas totais..... | 39 |
| 4.5.3. Grupos sulfato..... | 39 |
| 4.5.4. Ácidos urônicos..... | 39 |
| 4.5.5. Polarimetria..... | 40 |
| 4.6. MÉTODOS HIDRÓLITICOS..... | 40 |
| 4.6.1. Hidrólise ácida total..... | 40 |
| 4.7. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS..... | 40 |
| 4.7.1. Carboxi-redução..... | 40 |
| 4.7.2. Dessulfatação por tratamento solvolítico da fração carboxi- reduzida..... | 41 |
| 4.7.3. Degradação controlada de Smith..... | 42 |
| 4.8. ANÁLISE DE METILAÇÃO..... | 42 |
| 4.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS..... | 43 |
| 4.9.1. Cromatografia de troca iônica..... | 43 |
| 4.9.2. Cromatografia gasosa acoplada à Espectrofotometria de Massa (CG-EM)..... | 44 |
| 4.9.3. Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC-MALLS)..... | 45 |

| | |
|---|---------------|
| 4.10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS..... | 45 |
| 4.10.1. Ressonância Magnética Nuclear..... | 45 |
| 4.10.1.1. Técnicas de RMN Monodimensionais..... | 46 |
| a) Ressonância Magnética Nuclear do Carbono – 13 (RMN de ¹³ C)..... | 46 |
| b) Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ¹ H)..... | 46 |
| 4.10.1.2. Técnica de RMN Bidimensional..... | 47 |
| a) HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy)..... | 47 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 48 |
| 5.1. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. brasiliensis</i> | 48 |
| 5.2. FRAÇÕES BRUTAS..... | 48 |
| 5.2.1. Rendimentos e análises químicas..... | 48 |
| 5.2.2. Composição monossacarídica..... | 50 |
| 5.2.3. Análises de homogeneidade..... | 51 |
| 5.2.4. Análises de RMN ¹³C..... | 52 |
| 5.3. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA GB..... | 53 |
| 5.3.1. Cromatografia de troca iônica..... | 53 |
| 5.3.2. Ultrafiltração em membrana..... | 56 |
| 5.4. ANÁLISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO HOMOGÊNEA GBH..... | 58 |
| 5.4.1. Análises químicas..... | 58 |
| 5.4.2. Composição monossacarídica..... | 59 |
| 5.4.3. Carboxi-redução da fração GBH..... | 60 |
| 5.4.4. Dessulfatação solvolítica da fração GBH-R..... | 63 |
| 5.5. ANÁLISES DE RMN DAS FRAÇÕES GBH, GBH-R E GBH-RD..... | 63 |
| 5.6. ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES GBH-R E GBH-RD..... | 71 |
| 5.7. ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DA FRAÇÃO GBH..... | 75 |
| 5.7.1. Análises químicas e composição monossacarídica da fração degradada de Smith (GBH-S)..... | 76 |
| 5.7.2. Análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR da fração degradada de Smith (GBH-S)..... | 77 |
| 5.7.3. Análise de RMN de ¹³C e ¹H da fração degradada de Smith (GBH-S).. | 80 |
| 5.7.4. Fracionamento do produto de degradação controlada de Smith (GBH-S)..... | 81 |
| 5.7.4.1. Análise de homogeneidade das frações de maior rendimento obtidas após cromatografia de troca iônica da fração GBH-S..... | 82 |
| CAPÍTULO II - BIOATIVIDADE DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA MACROALGA VERDE MARINHA <i>G. brasiliensis</i>..... | 86 |
| 6. OBJETIVOS..... | 87 |
| 6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 87 |
| 6.1. OBJETIVO GERAL..... | 87 |
| 7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 88 |
| 7.1. MODULAÇÃO DA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS POR CARBOIDRATOS..... | 88 |
| 7.1.1. Formação de vasos sanguíneos e do sistema cardiovascular..... | 89 |
| 7.1.2. Sinalização celular na formação de vasos sanguíneos..... | 91 |

| | |
|---|------------|
| 7.1.3. Vascularização e o desenvolvimento de tumores..... | 93 |
| 7.1.4. Modulação da vascularização por polissacarídeos sulfatados..... | 95 |
| 7.1.5. Modelo experimental <i>in vivo</i> (embriões de <i>Gallus domesticus</i>)..... | 97 |
| 7.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS..... | 101 |
| 7.2.1. Gliomas (astrocitomas)..... | 103 |
| 7.3. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS..... | 105 |
| 7.4. ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS | 109 |
| 7.4.1. Polissacarídeos sulfatados de algas verdes com atividade contra os vírus Herpes Simplex (HSV)..... | 109 |
| 8. MATERIAL E MÉTODOS..... | 112 |
| 8.1. MODULAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO EM EMBRIÕES DE GALINHA..... | 113 |
| 8.1.1. Modelo Biológico – Embriões de <i>G. domesticus</i>..... | 113 |
| 8.1.2. Ensaio da vasculogênese na membrana vesícula vitelínica..... | 113 |
| 8.1.3. Ensaio da angiogênese na membrana corioalantóica..... | 116 |
| 8.1.4. Análise estatística..... | 117 |
| 8.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vitro</i> | 119 |
| 8.2.1. Linhagem celular utilizada..... | 119 |
| 8.2.2. Preparação das frações polissacarídicas para o ensaio biológico..... | 119 |
| 8.2.3. Determinação da viabilidade celular das células de astrocitoma..... | 120 |
| 8.2.4. Análise estatística..... | 120 |
| 8.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE..... | 121 |
| 8.3.1. Ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)..... | 121 |
| 8.3.2. Ensaio de tempo de trombina (TT)..... | 121 |
| 8.3.3. Ensaio de tempo de trombina (TP)..... | 122 |
| 8.3.4. Análise estatística..... | 122 |
| 8.4. ENSAIOS ANTIVIRAIS..... | 122 |
| 8.4.1. Células e Vírus..... | 123 |
| 8.4.2. Ensaio citotóxico..... | 123 |
| 8.4.3. Ensaio de atividade antiviral..... | 124 |
| 8.4.4. Cinética de inibição viral (curva dose-resposta)..... | 124 |
| 8.4.5. Mecanismos de ação..... | 125 |
| 8.4.6. Ensaio de atividade virucida..... | 125 |
| 8.4.7. Ensaio de atividade sobre o receptor celular..... | 126 |
| 8.4.8. Ensaio de atividade na penetração viral..... | 126 |
| 9. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 127 |
| 9.1. ATIVIDADE MODULADORA DA VASCULARIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. brasiliensis</i> | 127 |
| 9.1.1. Tratamentos realizados na membrana vitelínica (vasculogênese)..... | 127 |
| 9.1.2. Tratamentos realizados na membrana corioalantoica (angiogênese)..... | 138 |
| 9.1.3. Mecanismo de ação das heteroramnanas sulfatadas de <i>G. brasiliensis</i> sobre a vascularização..... | 145 |
| 9.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. brasiliensis</i> | 147 |
| 9.2.1. Análise da viabilidade de células tumorais..... | 147 |

| | |
|---|------------|
| 9.2.2. Viabilidade celular de células U87MG após tratamento com polissacarídeos por 24 e 48 horas..... | 147 |
| 9.3. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. brasiliensis</i> | 152 |
| 9.3.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)..... | 152 |
| 9.3.2. Tempo de Trombina (TT)..... | 154 |
| 9.3.3. Tempo de Protrombina (TP)..... | 156 |
| 9.4. ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA O HSV-1 E O HSV-2 DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. brasiliensis</i> | 159 |
| 10. CONCLUSÕES..... | 164 |
| CAPITULO I..... | 164 |
| CAPITULO II..... | 165 |
| REFERÊNCIAS..... | 167 |

1. INTRODUÇÃO

Decorrente da grande diversidade estrutural, os carboidratos atuam como importantes codificadores de informações tanto à nível fisiológico como patológico tais como, infecções virais e bacterianas, crescimento tumoral, metástase, inflamação entre outros.

As algas marinhas são uma excelente fonte de polissacarídeos sulfatados com estruturas químicas particulares onde a grande maioria das espécies da biodiversidade nacional não foi investigada em termos da sua diversidade química. Alguns polissacarídeos sulfatados de algas marinhas apresentam atividades biológicas com potencial aplicação farmacológica, tais como, atividades antitrombótica, antiangiogênica, antitumoral, antiviral, anti-inflamatória, ação antilipidêmica entre outras atividades.

Deste modo, considerando a crescente necessidade mundial de novas drogas com ação terapêutica, muitos dos polissacarídeos e/ou oligossacarídeos isolados de algas marinhas e caracterizados quimicamente, podem representar uma fonte de moléculas a serem exploradas como novas drogas para o desenvolvimento de agentes com efetiva aplicação farmacológica.

Considerando que poucas espécies de algas verdes, inclusive do Brasil tiveram a estrutura de seus polissacarídeos determinada e que esta biomassa representa uma fonte de novas moléculas, o grupo de pesquisa do laboratório de glicobiologia estrutural de algas marinhas (GLICAM) da UFPR tem analisado a estrutura química de algumas espécies de algas verdes e avaliado seu potencial como moléculas bioativas.

Análises estruturais dos polissacarídeos de algas verdes têm demonstrado que estes polímeros são estruturalmente diversos dos produzidos pelas algas vermelhas ou pardas. Além disto, as algas verdes representam uma biomassa pouco explorada quando comparada as das algas vermelhas (produtoras de carragenanas e agaranas), ou das algas pardas (produtoras de alginatos) os quais são produtos comerciais amplamente utilizados em diferentes setores da indústria.

Os diferentes tipos de propriedades biológicas apresentadas por polissacarídeos sulfatados estão associadas ao tipo de unidade monossacarídica que constitui o polímero, ao posicionamento e teor dos grupos substituintes, de

maneira particular aos grupos sulfato, e massa molar. Estes fatores são responsáveis pela conformação da molécula e, portanto, relacionados diretamente com a atividade biológica em estudo. Deste modo a análise da estrutura química de polissacarídeos é de fundamental importância para que se possa correlacionar dados estruturais com os resultados de atividade biológica. Este conhecimento abre perspectivas de projeção de compostos com maior atividade onde modificações químicas no polímero ou nos seus produtos de degradação parcial podem gerar moléculas com potencial aplicação farmacológica.

Deste modo, o presente trabalho dá continuidade aos estudos com polissacarídeos sulfatados de macroalgas verdes marinhas enfocando o estudo de uma nova espécie de alga *Gayralia brasiliensis*, a qual foi recentemente descrita. Estes estudos objetivam a análise estrutural dos polissacarídeos sulfatados produzidos por *G. brasiliensis* (CAPÍTULO I), bem como a avaliação da potencial aplicação biotecnológica destes polissacarídeos e de seus produtos modificados quimicamente como compostos antivasculogênico/antiangiogênicos, antitumorais, anticoagulantes e antivirais (CAPÍTULO II).

CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA MACROALGA VERDE MARINHA *Gayralia brasiliensis*

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente Capítulo deste trabalho tem por objetivo geral caracterizar a estrutura química de polissacarídeos sulfatados obtidos da macroalga verde marinha *Gayralia brasiliensis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os polissacarídeos solúveis em meio aquoso a 25 °C e a 80 °C;
- Purificar os polissacarídeos solúveis obtidos por extração aquosa;
- Determinar a estrutura química da fração polissacarídica purificada por métodos químicos (hidrólise total, carboxi-redução, dessulfatação solvolítica, análise de metilação);
- Determinar a estrutura química da fração polissacarídica purificada por métodos espectroscópicos (ressonância magnética nuclear monodimensional e bidimensional);
- Obter frações de menor massa molar da fração purificada por degradação Controlada de Smith para estudos estruturais e de atividade biológica (CAPÍTULO II).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ALGAS MARINHAS

Algae é definido por uma população não homogênea de organismos marinhos e as algas marinhas pertencem a este grupo sendo subdividido em três reinos: Reino Plantae, Reino Monera ou Bactéria e Reino Protista. As algas azuis ou cianofíceas, procariontes, organismos unicelulares e autótrofos constituem o Reino Monera. Estes organismos foram os primeiros seres vivos a aparecerem no planeta, se caracterizam por seu habitat em ambientes úmidos e sobrevivência onde há escassez de nutrientes (CARVALHO; ROQUE, 2000; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Esses organismos podem ser encontrados em oceanos, águas doces, solos, rochas e superfície de outros vegetais como simbiontes (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Distintamente do Reino Monera, os organismos pertencentes ao Reino Protista são eucariontes, unicelulares e pluricelulares (de organização simples), heterótrofos ou autótrofos. As algas que pertencem a este Reino são constituídas por pigmentos, a exemplo da clorofila, caroteno e xantofilas. Devido à presença destes pigmentos, estas algas são capazes de realizar a fotossíntese (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

O Reino Plantae se caracteriza por englobar os organismos eucariontes, pluricelulares e autótrofos. As algas marinhas dos filos Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta são integrantes deste reino. O filo Phaeophyta é composto pelas algas pardas que são organismos pluricelulares encontrados somente em ambientes marinhos e o filo Rhodophyta é constituído pelas algas vermelhas, que contêm o pigmento ficoeritrina no interior das suas células, responsável pela sua coloração avermelhada. O filo Chlorophyta compreende a maioria das algas verdes, as quais podem ser encontradas em ambientes úmidos, água doce e em oceanos (CARVALHO; ROQUE, 2000; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

3.1.1. Algas verdes

As algas verdes são encontradas em ambientes aquáticos, como nos oceanos e em águas doces. Podem ser encontradas também em solos úmidos ou troncos de vegetais e até sobre a neve. Alguns tipos de líquens também são formados pela associação de algas verdes e fungos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Através da fotossíntese, as algas verdes, também chamadas de clorofíceas, são os principais produtores de oxigênio molecular disponível no planeta (LEWIS; McCOURT, 2004; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Tanto as espécies macroscópicas quanto as microscópicas de algas verdes possuem cloroplastos, que são constituídos por duas membranas contendo os dois tipos de clorofilas A e B, o que caracteriza a coloração esverdeada destes organismos. Outros pigmentos acessórios são sintetizados por estas algas, como o betacaroteno e as xantofilas e o amido é a principal substância de reserva nas células de algas. Por possuírem o mesmo tipo de clorofila das plantas terrestres, as algas são consideradas ancestrais dos vegetais terrestres (LEWIS; McCOURT, 2004; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Através da evolução, duas grandes linhagens Chlorophyta e Charophyta deram origem às algas verdes. A maioria das algas verdes descritas e denominadas tradicionalmente de algas verdes pertence ao filo Chlorophyta. Esse filo é subdividido em três classes: Chlorophyceae, Pleurostrophyceae e Ulvophyceae. Algas verdes terrestres que evoluíram das algas aquáticas e uma grande variedade de algas verdes pertencem ao filo Charophyta (LEWIS; McCOURT, 2004).

A macroalga verde marinha *Gayralia brasiliensis*, utilizada neste trabalho, pertence à classe Ulvophyceae (Chlorophyta). As algas verdes marinhas mais conhecidas são a *Ulva* (alface-do-mar), *Codium*, *Caulerpa*, *Acetabularia* e alguns gêneros de água doce como *Pithophora*, *Cladophora* e *Rhizoclonium* (LEWIS; McCOURT, 2004).

As macroalgas verdes são amplamente distribuídas na natureza. No Brasil, elas podem ser encontradas ao longo da costa brasileira. Uma grande concentração de diferentes espécies de algas verdes habitam a costa nordeste do país e os costões rochosos do Espírito Santo e Santa Catarina. No entanto, algumas espécies

são encontradas nas praias arenosas dos estados de São Paulo e do Paraná (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

As algas desempenham diversas funções no ecossistema aquático, como a produção de biomassa, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos, além de produzirem oxigênio que é utilizado pelos organismos aquáticos. Estas algas também servem de alimento para diferentes espécies de organismos aquáticos e para seres humanos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Os povos orientais utilizam as macroalgas verdes como fonte de alimentos há milênios. Este interesse é devido aos altos índices de fibras dietéticas, ácidos graxos poli-insaturados, minerais e vitaminas (ITO; HORI, 1989; ZUBIA *et al.*, 2009).

As algas marinhas também são empregadas na indústria alimentícia por possuírem propriedades espessantes, gelatinizantes e estabilizantes. Estas propriedades são devido à presença de polissacarídeos na parede celular destas algas. Estes polissacarídeos também têm sido investigados quanto as suas atividades biológicas (DAMONTE; MATULEWICZ; CERESO, 2004; YUANA *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2009; CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011; COSTA *et al.*, 2010; CARVALHO, 2013).

3.2. GÊNERO *Gayralia*

Gayralia é um gênero de macroalgas verdes marinhas monostromáticas. São amplamente distribuídas em regiões marinhas de clima temperado a clima tropical (LELIAERT *et al.*, 2012). Polissacarídeos sulfatados com propriedades antivirais e antitumorais foram recentemente isolados da espécie *Gayralia oxysperma* (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011; CARVALHO, 2013). No entanto, a taxonomia, a biologia, a filogenia e a biogeografia deste gênero permanecem, em grande parte, escassas. A taxonomia sofreu várias mudanças de nomenclatura desde 1960, a exemplo da espécie *G. oxysperma*, que tem sido erroneamente identificada como *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Blinding ou *Monostroma oxyspermum* (Kützinger) Doty (GAYRAL, 1965, BLIDING, 1968, VINOGRADOVA, 1969).

A alga *G. oxysperma* tem sido colhida esporadicamente durante as últimas décadas por moradores locais e vendidas com a finalidade de alimentação. No

entanto, sua produção é limitada no meio ambiente. Devido a esse fato, pesquisadores estudaram as melhores condições de cultivo das espécies de *Gayralia*. Neste estudo, foi elaborada uma nova técnica de cultivo através de redes suspensas. Através desta técnica, a produção poderia se tornar uma fonte de renda sustentável durante o ano todo aos moradores da região costeira do Paraná. (PELLIZZARI; OLIVEIRA; YOKOYA, 2004; PELLIZZARI *et al.*, 2007).

A espécie utilizada no presente trabalho, *Gayralia brasiliensis*, antes referenciada como *Monostroma* sp. (NASATTO, 2012), se difere de *G. oxysperma* em seu habitat na zona intertidal das costas brasileiras. Enquanto *G. brasiliensis* pode ser encontrada ao longo da costa brasileira, o habitat de *G. oxysperma* se limita as costas da região sul (Paraná e Santa Catarina) e sudeste (São Paulo). Macroscopicamente as duas algas são muito similares, portanto algumas ferramentas taxonômicas como, por exemplo, a análise molecular é necessária para diferir as duas espécies (PELLIZZARI *et al.*, 2013).

Estudos pioneiros a respeito da estrutura química dos polissacarídeos de *G. oxysperma* foram realizados por pesquisadores do grupo de Química de Carboidratos da UFPR. Cassolato e colaboradores (2008) determinaram a estrutura química fina dos polissacarídeos que compõem a macroalga verde e avaliaram sua atividade antiviral. Em 2011, Ropelatto iniciou os estudos de atividade antitumoral dos polissacarídeos sulfatados de *G. oxysperma* com linhagens de células tumorais de glioma humano (U373MG e U87MG). E mais recentemente, Carvalho (2013) deu continuidade a essa pesquisa, utilizando as mesmas linhagens de células tumorais, avaliando o mecanismo de ação dos produtos de menor massa molar, obtidos por degradação controlada de Smith, a partir dos polissacarídeos sulfatados.

G. brasiliensis é uma nova espécie, recentemente descrita por Pellizzari e colaboradores (2013), onde pela primeira vez no presente trabalho, estudos da estrutura química e de atividade biológica dos polissacarídeos obtidos desta espécie foram realizados.

As algas da espécie *G. brasiliensis* obtidas para os estudos neste trabalho foram coletadas na baía de Paranaguá, município de Paranaguá-PR, sendo identificadas e cedidas pela Dra. Franciane M. Pellizzari (Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá).

3.3. POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS

3.3.1. Distribuição dos polissacarídeos sulfatados na natureza

Organismos animais (vertebrados e invertebrados) sintetizam polissacarídeos sulfatados (CÁSSARO; DIETRICH, 1977; MOURÃO; PEREIRA, 1999; MOURÃO, 2004; DREYFUSS *et al.*, 2009). No entanto, os vegetais (algas e angiospermas marinhas) também são capazes de produzir polissacarídeos sulfatados naturalmente (AQUINO *et al.*, 2005; CASSOLATO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012). Neste sentido, têm despertado grande interesse nestes polissacarídeos sulfatados obtidos de fonte não animal como agentes farmacológicos naturais em diversas doenças (ROPELATTO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012).

Os polissacarídeos sulfatados obtidos de fontes animais estão presentes como proteoglicanos, compondo a matriz extracelular e a superfície celular. As proteoglicanas são constituídas por cadeias de glicosaminoglicanas que estão ligadas covalentemente a uma proteína central (DREYFUSS *et al.*, 2009). Estas glicosaminoglicanas são compostas por unidades de dissacarídeos repetitivos, constituídos de hexosaminas e por ácido urônico (ácido glucurônico ou ácido idurônico) ou galactose (no queratam sulfato), além de possuírem grupos sulfato em diversas posições. Os mais comuns são os galactosaminoglicanos (condroitina-sulfato e dermatam sulfato) e os glucosaminoglicanos (heparam sulfato, heparina e sulfato de queratina) (KJELLÉN; LINDAHL, 1991).

Uma justificativa para a presença de polissacarídeos sulfatados em organismos vegetais, como as algas marinhas é que, nos primórdios da vida nos oceanos, os organismos marinhos precisaram se adaptar às grandes concentrações de sais presentes no meio. Deste modo, desenvolveram mecanismos para utilização dos nutrientes disponíveis, onde altas concentrações de íons neste ambiente (cloreto, brometo, sulfato, e iodeto) resultaram na presença de compostos altamente sulfatados e halogenados nas algas marinhas. Assim é observado um acúmulo de ânions sulfato nos organismos que vivem em ambientes com altas concentrações de íons (CARVALHO; ROQUE, 2000).

Organismos evolutivamente distantes presentes em diferentes ambientes marinhos sintetizam polissacarídeos com características estruturais semelhantes, principalmente as fucanas e as galactanas sulfatadas. Estes estudos sugerem que a ocorrência de polissacarídeos sulfatados em organismos marinhos seja de fato, uma adaptação de sobrevivência ao meio. Gramíneas marinhas pertencem a um grupo de angiospermas que desenvolveram a capacidade de adaptação ao ambiente oceânico. Este grupo sintetiza altas quantidades de polissacarídeos sulfatados em contraste com as espécies de habitat terrestre e de água doce (AQUINO *et al.*, 2005).

Os polissacarídeos sulfatados produzidos pelas algas marinhas vermelhas (Rhodophyta) são encontrados como galactanas sulfatadas, mais conhecidas como agaranas e carragenanas. Estudos revelaram que a cadeia principal deste polissacarídeo é constituída por unidades de galactose ligadas alternadamente por ligações do tipo α -(1→3) e β -(1→4). Nestas cadeias, as unidades β -ligadas pertencem à série D- e as unidades α -ligadas podem se apresentar à série D- ou L-galactose, ocorrendo parcialmente como 3,6-anidrogalactose. A principal diferença entre as galactanas é pela presença de outros grupos substituintes e pela concentração de grupos sulfato. Estas galactanas formam a matriz maleável que constitui a estrutura fibrosa da parede celular destas algas (SHANMUGAM; MODY, 2000; CARVALHO; ROQUE, 2000; DUARTE *et al.*, 2002; AQUINO *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2012).

Nas algas pardas (Phaeophyta) os polissacarídeos estão presentes na forma de fucanas. Estes são heteropolissacarídeos sulfatados e compostos majoritariamente por fucose, ácido glucurônico e xilose. Em algumas espécies de algas pardas também se observa a presença de galactose e manose. Os compostos denominados de fucoidan, fucoidanas e sargaço também estão inseridos neste grupo. As fucanas compõem a matriz da parede celular deste filo (PAINTER, 1983; SHANMUGAM; MODY, 2000; CARVALHO; ROQUE, 2000; DUARTE *et al.*, 2001a; AQUINO *et al.*, 2005; FERREIRA, 2012).

Heteropolissacarídeos sulfatados como glucuronoxiloramnanas, glucuronoxiloramnogalactanas e xiloarabinogalactanas estão presentes nas algas verdes (Chlorophyta) e compõem a matriz da parede celular destas algas. Polissacarídeos sulfatados de algas verdes que se encontram ligados covalentemente a proteínas são classificados como proteoglicanas (PAINTER, 1983;

SHANMUGAM; MODY, 2000; AQUINO *et al.*, 2005). Algumas espécies de macroalgas verdes marinhas produzem polissacarídeos constituídos principalmente por unidade de ramnose, sendo chamados de ramnanas (CASSOLATO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2012).

3.3.2. Composição química e estrutura dos polissacarídeos presentes no gênero *Gayralia*

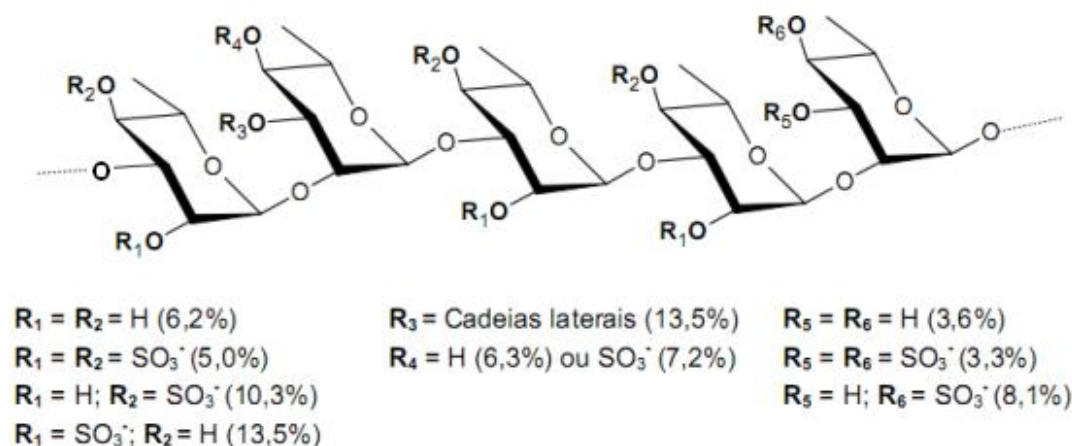
Como os relatos sobre os polissacarídeos do gênero *Gayralia* se limitam aos trabalhos realizados pelo grupo do laboratório Glicam do Departamento de Bioquímica e Biologia molecular da UFPR, este item enfocará principalmente as pesquisas realizadas por Cassolato e colaboradores (2008), Ropelatto (2011) e Carvalho (2013) com a macroalga verde *G. oxysperma*.

Nos trabalhos de Cassolato e colaboradores (2008) e Ropelatto (2011) os polissacarídeos sintetizados por *G. oxysperma* foram obtidos através de extrações aquosas a frio (25 °C) e a quente (80 °C) gerando frações polissacarídicas brutas. A extração a 80 °C resulta em um maior rendimento em relação à extração a frio (25 °C). As frações brutas obtidas por extração a 80 °C foram constituídas majoritariamente por unidades de ramnose (56,0 – 88,6 mol%), apresentando menores concentrações de outros monossacarídeos como a xilose (3,9 – 10,4 mol%), arabinose (3,0 – 10,1 mol%), glucose (2,8 – 21,0 mol%), galactose (2,1 – 6,2 mol%) e manose (1,2 – 2,5 mol%). Estes polissacarídeos são altamente sulfatados (21,2 – 30,9%) o que está de acordo com outras espécies de algas verdes, a exemplo das algas da ordem Ulvales, que apresentam grau de sulfatação entre 6,0 e 28,0%. Adicionalmente, foi detectada a presença de ácidos urônicos (12,2 – 17,0%) nestes polissacarídeos, que correspondem aos ácidos glucurônico e galacturônico.

A fração polissacarídica de maior rendimento obtida a 80 °C, foi submetida ao processo de ultrafiltração em membrana (limite de exclusão de 300 kDa) onde se obteve uma fração retida e outra eluída. A fração retida na membrana apresentou-se homogênea em relação à massa molar, estimada em 1519 kDa. Esta fração homogênea foi selecionada para os estudos de estrutura química dos seus polissacarídeos. Análises químicas e espectroscópicas demonstraram que a fração

homogênea correspondia a uma heteroramnana ramificada e altamente sulfatada (~28%). Este polissacarídeo continha unidades de α -L-ramnose 2,3-dissubstituídas, 2- e 3-ligadas na proporção de aproximadamente 1:1:3, as quais se encontravam 53,0, 54,0 e 29,0% sulfatadas em C-4. Grupos sulfato também encontravam-se nos carbonos C-2 (38,0%), C-2 e C-4 (14,0%) das unidades de ramnose 3-ligadas e nas unidades 2-ligadas, nos carbonos C-3 e C-4 (22,0%). Sulfatos em C-2 (80,0%) dos ácidos urônicos também foram detectados. Verificou-se assim, que a heteroramnana apresentava um ponto de ramificação a cada cinco unidades de ramnose na cadeia principal (CASSOLATO *et al.*, 2008).

Em resumo, a Figura 1 apresenta as principais unidades de ramnose que constituem a heteroramnana sulfatada obtida de *G. oxysperma*.



NOTA: % = mol%. Cadeias laterais contêm como terminais não redutores: Glc₆P₂-sulfato (5 mol%) ou Gal₆P₂A 2-sulfato (~4 mol%) ou Xil₆P (5 mol%).

FIGURA 1 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA DE *G. oxysperma*.

FONTE: CASSOLATO (2008).

3.3.3. Produtos de degradação controlada de Smith obtidos de polissacarídeos sulfatados de *Gayralia*

Metodologias que promovem a redução da massa molar dos polissacarídeos ácidos produzidos pelas clorófitas são utilizadas para facilitar os estudos estruturais destes polímeros. O método de degradação controlada de Smith, utilizado em nosso grupo de pesquisa (GLICAM), é uma ferramenta importante que facilita o estudo estrutural de tais compostos tão complexos (LAHAYE; BRUNEL; HAYAKAWA, 2000; RAY, 2006; ROPELATTO, 2011).

O método de degradação controlada de Smith baseia-se na oxidação dos polissacarídeos que possuam hidroxilas vicinais através do íon periodato, onde ocorre a clivagem específica de ligações entre os carbonos. Neste método, a hidrólise ácida leve permite que as unidades resistentes ao íon periodato permaneçam intactas. Isto ocorre porque os derivados alcoólicos, por serem acetais verdadeiros são mais sensíveis aos ácidos, enquanto nestas condições de hidrólise, as ligações glicosídicas são mais resistentes (CORRÊA, 1971).

Com o objetivo de se obter mais informações sobre a estrutura química dos polissacarídeos sulfatados obtidos de *G. oxysperma*, Cassolato e colaboradores (2008) submeteram frações polissacarídicas purificadas à degradação controlada de Smith e obtiveram os produtos degradados de Smith. Frações polissacarídicas nativas também foram submetidas ao mesmo método por Ropelatto (2011) e Carvalho (2013).

Os produtos de degradação controlada de Smith, em relação à fração de origem, apresentaram aumento significativo nos teores de ramnose (64,1 → 91,4 mol%), diminuição dos teores de xilose (13,5 → 3,0 mol%), de glucose (18,8 → 5,6 mol%) e galactose (3,6 → 0 mol%). Os teores de grupos sulfato não sofreram alterações (~26%). Através de análise por HPSEC-MALLS-IR, essa fração se mostrou homogênea e a sua massa molar foi estimada em 109 kDa, portanto, um decréscimo de ~14 vezes da fração polissacarídica de origem (1519 kDa) foi observado, quando essa fração foi submetida ao método de degradação controlada de Smith (CASSOLATO *et al.*, 2008).

Os produtos de degradação controlada de Smith, obtidos a partir do extrato polissacarídico bruto, também apresentaram um aumento no grau de sulfatação da

molécula (25,7 → 34,3%) e também nos teores de ramnose (75,0 → 88,8 mol%). Duas frações homogêneas foram obtidas a partir dos produtos de degradação controlada de Smith, através de cromatografia de troca iônica. As massas molares dessas frações foram de 109,3 e de 251 kDa. Nos ensaios de citotoxicidade contra células tumorais de glioma humano, a fração de maior massa molar, com maior grau de sulfatação e com maior concentração de unidades de ramnose dissulfatadas, foi mais efetiva que a fração de massa molar 109,3 kDa (ROPELATTO, 2011).

A fração homogênea de maior massa molar (251 kDa) foi altamente sulfatada (41%) e composta majoritariamente por unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas e ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas. A fração de menor massa molar foi constituída qualitativamente pelos mesmos tipos de unidades de ramnose sulfatadas presentes na fração de massa molar de 251 kDa, no entanto, apresentou um teor significativamente menor de unidades de ramnose 2-ligadas 3,4-sulfatadas e teores menos expressivos em termos de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas (ROPELATTO, 2011).

A degradação controlada de Smith é utilizada, basicamente, com o objetivo de se obter mais informações sobre a estrutura química dos polissacarídeos sulfatados de estrutura complexa. No entanto, visto que os polissacarídeos após serem submetidos a esta técnica apresentam características estruturais diferenciadas, como por exemplo, maiores teores de grupos sulfato e diminuição da massa molar, os produtos de degradação controlada de Smith podem ser moléculas promissoras nos estudos de bioatividade.

Neste sentido, o presente trabalho descreve as características químicas dos polissacarídeos obtidos de *G. brasiliensis*, bem como os produtos de degradação controlada de Smith (CAPÍTULO I) e a atividade biológica dessas moléculas (CAPÍTULO II).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ESPÉCIE *G. brasiliensis* E SEU POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO

O aspecto geral da alga estudada neste trabalho está apresentado na Figura 2 e a classificação pertence a:

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridiaeplantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Família: Gayraliaceae

Gênero: *Gayralia*

Espécie: *Gayralia brasiliensis* nov. Pellizzari, M.C. Oliveira et N.S. Yokoya.



FIGURA 2 – ASPECTO GERAL DA CLÓROFITA *G. brasiliensis*.

FONTE: PELLIZZARI *et al.*, 2013.

A excicata da espécie *G. brasiliensis* foi depositada no herbário do Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e

Letras de Paranaguá, sob o número SPF56198 (11 Agosto de 2006; Franciane M. Pellizzari).

4.2. COLETA E PROCESSAMENTO

Os exemplares de *G. brasiliensis* obtidas foram coletadas na baía de Paranaguá, município de Paranaguá-PR, sendo identificadas e cedidas por Franciane M. Pellizzari (Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá).

A alga verde *G. brasiliensis* foi inicialmente lavada em água doce, seca em estufa a 25 – 30 °C e moída em moinho de faca (Wiley Mill). Após esta etapa, a alga foi submetida ao processo de extração aquosa como descrito a seguir.

4.3. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA *G. brasiliensis*

A alga seca e moída foi inicialmente submetida à extração aquosa (5% m/v) sob agitação mecânica, em temperatura de 25 °C por 4 horas, sendo este processo realizado por duas vezes. Após cada etapa, os extratos aquosos foram centrifugados a 7.700 x g por 20 minutos e concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida. Aos sobrenadantes adicionou-se etanol (3:1 v/v) para precipitação dos polissacarídeos. Os precipitados foram separados por centrifugação, reunidos e ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados. As frações brutas obtidas foram denominadas Gb1 e Gb2 (*G. brasiliensis*), correspondendo a primeira e a segunda extrações aquosas a 25 °C, respectivamente.

Os precipitados das algas foram sequencialmente submetidos a extrações aquosas a 80 °C (5% m/v), em banho-maria, sob agitação mecânica, durante 4 horas (4 vezes). Após cada etapa, os extratos aquosos foram centrifugados a 7.700 x g por 20 minutos, submetidos à redução de volume (em rotaevaporador), precipitados com etanol (3:1 v/v) e centrifugados. Os polissacarídeos precipitados foram ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados,

originando as frações brutas Gb3, Gb4, Gb5 e Gb6 (*G. brasiliensis*), correspondendo à primeira, segunda, terceira e quarta extrações a 80 °C, respectivamente. Os resíduos das algas foram guardados em congelador.

4.4. ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA

As frações obtidas por extração a 80 °C (Gb3, Gb4, Gb5 e Gb6) foram reunidas e essa fração foi nomeada GB. Para o fracionamento dos polissacarídeos sulfatados presentes na fração bruta GB, realizou-se ultrafiltração em membrana de celulose regenerada ou polietersulfona com limite de exclusão de 100 kDa, 300 kDa e 500 kDa (Millipore). As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração modelo 16249, SARTORIUS, acoplado a um cilindro de ar comprimido.

Neste método os polissacarídeos da fração GB foram solubilizados em água, em uma concentração de 0,1 g%, e submetidos à filtração em cilindro, sob pressão, sendo obtido um material retido (acréscimo da letra “H”) na membrana e um material eluído (acréscimo da letra “E”).

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

4.5.1. Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram quantificados através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Como padrão utilizou-se a ramnose (solução de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 480 nm (linearidade entre 10 – 50 μg de açúcar).

4.5.2. Proteínas totais

O método de Lowry e colaboradores (1951) foi aplicado para dosagem das proteínas totais utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu. O padrão utilizado foi solução de BSA (albumina de soro bovino) na concentração de 1 mg.mL^{-1} . As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm (linearidade entre 5 – 100 μg de proteína).

4.5.3. Grupos sulfato

Os teores de grupos sulfato foram determinados utilizando como reagente a mistura gelatina-bário (DODGSON e PRICE, 1962). Inicialmente foi realizada a hidrólise total dos polissacarídeos com HCl 1M por 5 horas na temperatura de 105 °C que ocasiona a liberação dos grupamentos sulfato. O sulfato em contato com o íon bário (solução como BaCl_2) forma um composto insolúvel, o BaSO_4 . Este composto se mantém em suspensão devido à presença da gelatina (Oxoid) o que deixa a solução com aspecto de turbidez, sendo medida em espectrofotômetro. O padrão utilizado foi uma solução de sulfato de sódio, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 360 nm (linearidade entre 20 – 200 μg de sulfato).

4.5.4. Ácidos urônicos

Os ácidos urônicos foram dosados através do método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), utilizando o *m*-hidroxibifenila. Glucoronato de sódio na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi utilizado como padrão. O método apresenta. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm (linearidade entre 1 – 38 μg de ácidos urônicos).

4.5.5. Polarimetria

A rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{25^\circ}$) foi determinada com as amostras na concentração de 0,2 g% em água na temperatura de 25 °C. Foram utilizadas cubetas de 10 cm de comprimento em polarímetro (RUDOLPH RESEARCH) no comprimento de onda de 589,3 nm.

4.6. MÉTODOS HIDRÓLITICOS

4.6.1. Hidrólise ácida total para composição monossacarídica

Os polissacarídeos (~1 mg) da macroalga *G. brasiliensis* foram hidrolisados com TFA 1 M por 4 horas a 100 °C. Os monossacarídeos hidrolisados foram reduzidos com NaBH₄ por 15 horas a temperatura ambiente. Após, foram neutralizados com ácido acético (1:1 v/v) sendo seu excesso transformado em ácido bórico. Para remoção do ácido bórico, as amostras foram co-destiladas com metanol (3 x), onde este ácido se encontrava na forma de borato de metila. Para acetilação dos alditóis foi utilizado 1 mL de anidrido acético (120 °C por 1 hora). Os acetatos de alditóis foram analisados por CG-EM.

4.7. MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS

4.7.1. Carboxi-redução

A metodologia de carboxi-redução foi realizada com a fração GBH. Neste método, os ácidos urônicos que constituem a cadeia polissacarídica são convertidos em ésteres pela carbodiimida [1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida] (CMC).

Desta forma, são reduzidos com NaBH_4 ou NaBD_4 a seu respectivo açúcar neutro (Ex: ácido glucurônico \rightarrow glucose).

A fração polissacarídica foi solubilizada em tampão MES 0,2 M (pH 4,75) e então a CMC é adicionada vagarosamente na proporção de 1,0 mM de carbodiimida:50 μEq de carboxila. Esta solução foi agitada por 1 hora e o pH ajustado para 7,0 através do tampão TRIS 2,0 M, então adicionou-se o NaBD_4 até a obter uma solução 2M. Após esta etapa, a solução foi mantida a 30 °C por 12 horas e neutralizada com ácido acético (1:1 v/v), dialisada contra água destilada e água miliQ em membrana de limite de exclusão de 6 – 8 kDa e liofilizada. Para identificação da fração carboxi-reduzida, foi adicionada a letra “-R” (carboxi-reduzido) ao nome original.

4.7.2. Dessulfatação por tratamento solvolítico da fração carboxi-reduzida

A dessulfatação da fração carboxi-reduzida (200 mg) foi realizada com os polissacarídeos na forma de sal de piridínio, onde a fração polissacarídica foi solubilizada em água destilada (30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo posteriormente adicionada a resina catiônica (DOWEX 50x8) na forma protonada (H^+) sob agitação por 30 minutos. O pH do sobrenadante foi medido (1,0 – 2,0). A separação da resina foi realizada por filtração e os filtrados foram neutralizados com piridina até pH 7,0 e então liofilizados (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

Os polissacarídeos na forma de sal de piridínio foram submetidos ao processo de solvólise. Para este processo, os polissacarídeos foram solubilizados em uma mistura de dimetilsulfóxido:metanol:piridina (proporção de 89:10:1) (v/v). Esse processo de solubilização foi realizado respeitando a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL da mistura (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979). As soluções foram mantidas a 100 °C (estufa) por 4 horas. Após, a solução foi mantida em temperatura ambiente até resfriamento, dialisada contra água destilada e liofilizada. Após este procedimento, a fração dessulfatada foi identificada pela adição da letra “D” (dessulfatado) ao nome original da mesma.

4.7.3. Degradação controlada de Smith

Para degradação controlada de Smith, 550 mg da fração GBH foram solubilizados em 300 ml de água destilada e posteriormente foram adicionados 300 mL da solução de $m\text{-NaIO}_4$ 0,1 M (metaperiodato de sódio), onde obteve-se uma concentração final de 0,05 M. Essa solução foi mantida a temperatura ambiente por 72 horas, sob agitação mecânica em ambiente escuro. Após, a solução foi tratada com etilenoglicol (40 mL) para consumir o excesso de $m\text{-NaIO}_4$, dialisada com água destilada em membrana de 6 – 8 kDa para eliminar o sal formado. Então, a solução foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Os polissacarídeos oxidados foram reduzidos com NaBH_4 por 20 horas a temperatura ambiente, neutralizados com ácido acético, dialisados e liofilizados (GOLDSTEIN *et al.*, 1965).

Os polissacarídeos oxidados da fração GBH foram submetidos ao processo de degradação controlada de Smith. Foi realizada a hidrólise ácida parcial com TFA 1 M na proporção de 10 mg de polissacarídeos por mL de TFA 1M durante 20 horas a temperatura ambiente, sob agitação. Após este período, a amostra foi neutralizada, dialisada contra água destilada (membrana de 6 – 8 kDa) e liofilizada (FURNEAUX; STEVENSON, 1990). Os produtos de degradação controlada de Smith foram identificados pela adição da letra “-S” (Smith) ao nome original da fração (GBH).

4.8. ANÁLISE DE METILAÇÃO

O processo de metilação dos polissacarídeos carboxi-reduzidos e dessulfatados foi realizado a partir da redução destes polímeros com NaBH_4 , sendo então dialisados contra água destilada por 12 horas para eliminar o excesso de NaBH_4 . Após foram dialisadas contra solução de trietilamina (5% m/v) durante 15 horas, para obtenção dos polissacarídeos solúveis no solvente aprótico dimetilsulfóxido (DMSO) que compõe o meio reacional da metilação. Os polissacarídeos foram recuperados na forma de sal de trietilamônio e liofilizados (STEVENSON; FURNEAUX, 1991).

O processo de metilação dos polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio foi realizado conforme o método de Ciucanu e Kerek (1984). Inicialmente, os polissacarídeos foram solubilizados em DMSO na proporção de 2 mL para cada 15 mg de polissacarídeo. Posteriormente, foi adicionado aproximadamente 30 mg de NaOH pulverizado sob agitação mecânica vigorosa durante 30 minutos. Passado este período foi adicionado o agente metilante CH_3I (iodometano) na proporção de 0,2 mL para cada 15 mg de polissacarídeo sob agitação mecânica vigorosa por mais 30 minutos. Esse processo de adição de NaOH e CH_3I foi repetido mais duas vezes completando o processo de metilação. Os polissacarídeos foram submetidos a três etapas de metilação e após cada etapa, submetidos à diálise contra água destilada e liofilizados.

Para a análise dos produtos metilados os polissacarídeos (~1 mg) foram submetidas à hidrólise com ácido fórmico 45% durante 16 horas a 100 °C. Em seguida foram reduzidos com NaBD_4 por 12 horas, neutralizados com ácido acético (1:1 v/v), co-distilados com metanol e acetilados com anidrido acético (1 mL) por 12 horas a temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por CG-EM após cada etapa de metilação.

4.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.9.1. Cromatografia de troca iônica

Os produtos de degradação controlada de Smith (335 mg) foram submetidos ao fracionamento por cromatografia de troca aniônica em coluna contendo DEAE-Sephacel na forma Cl^- (volume 200 mL). A fração foi solubilizada em água destilada e adicionada à coluna com eluição lenta de água para que houvesse completa interação dos polissacarídeos com gel. As frações polissacarídicas foram eluídas com água destilada e posteriormente com concentrações crescentes (0,5 M; 1 M; 1,5 M e 2 M) de NaCl.

O método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) foi utilizado para monitorar as eluições. As subfrações obtidas após cromatografia

foram concentradas em rotaevaporador, dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

Para identificação das frações resultantes, foram adicionados números ao nome original da fração. A fração eluída com água destilada foi identificada pela adição do número “1” e as frações eluídas com NaCl foram identificadas a partir da adição do número “2”, “3”, “4” e “5” em relação a concentração de NaCl 0,5 M; 1 M; 1,5 M e 2 M, respectivamente.

4.9.2. Cromatografia gasosa acoplada à Espectrofotometria de Massa (CG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massa (EM) foram realizadas em um cromatógrafo da marca VARIAN 3800. Este cromatógrafo é equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m) DB-225 MS (Durabond) e um espectrômetro de massa do tipo *Ion Trap*, marca Varian Saturn 2000R. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura inicial do forno foi de 50 °C. A temperatura do forno foi aumentada gradualmente, 40 °C por minuto até 220 °C para acetato de alditol (constante por 25 minutos), e aumentada da mesma forma até 210 °C para alditol acetato parcialmente metilado (constante por 30 minutos). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL por minuto. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons de 70 eV, com m/z (relação massa/carga) de 80 a 220 e 50 a 350 (para as frações carboxi-reduzidas com NaBD₄). Os cromatogramas foram analisados e integrados em *software* Varian MS Workstation. Esse método cromatográfico foi utilizado para quantificação relativa de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis parcialmente metilados. Essa quantificação foi realizada por meio dos tempos de retenção e perfis de fragmentação característico, através do impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976). Os perfis de fragmentação foram comparados aos padrões descritos por Sasaki *et al.* (2005).

4.9.3. Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC-MALLS)

As análises de homogeneidade e de massa molar ponderal média (M_w) das frações foram conduzidas com soluções dos polissacarídeos (1 mg.mL^{-1}) em solução de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm) solubilizadas em água milliQ. Após, as soluções foram filtradas em membranas de acetato de celulose (MILLIPORE) com limite de exclusão de $0,22 \mu\text{m}$. Foi utilizado um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com detector de índice de refração (IR) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY. Este detector de espalhamento de luz é composto por 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Quatro colunas de gel permeação WATERS foram utilizadas, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 em colunas Ultrahydrogeltm 2000, 500, 250 e 120, respectivamente. Como eluente foi utilizada uma solução de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm) sob pressão de 920 psi a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

A molar ponderal média (M_w) da fração homogênea foi determinada a partir de soluções de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg da amostra (1 mL de NaNO_3 0,1 M) e azida de sódio (200 ppm), sendo a amostra previamente filtrada (membrana Millipore $0,45 \mu\text{m}$). A massa molar da fração homogênea foi estimada a partir do perfil de eluição e dos valores de dn/dc . Os resultados foram analisados pelo *software* ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY) e OriginPro 8.5.

4.10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

4.10.1. Ressonância Magnética Nuclear

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro (BRUKER, modelo DRX 400, série Avance) em tubos de 5 mm de diâmetro e aproximadamente 20 cm de comprimento na temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Os

deslocamentos químicos foram expressos em ppm. Acetona foi empregada como padrão interno para as análises de ^{13}C , em 31,45 ppm e para ^1H em 2,225 ppm.

4.10.1.1. Técnicas de RMN Monodimensionais

a) Ressonância Magnética Nuclear do Carbono – 13 (RMN de ^{13}C)

A obtenção dos espectros de RMN de ^{13}C foi realizada na frequência base de 100,16 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições. Utilizou-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram solubilizadas em D_2O diluída em água destilada na proporção de 1:10, na concentração de $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (pH 7).

b) Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos na frequência base de 400,13 MHz. Para isto, foi realizada a troca dos hidrogênios das hidroxilas das unidades monossacarídicas por deutério. Para a completa remoção das moléculas de água presentes através da dissolução das frações em D_2O , foram realizadas três etapas de solubilização dos polissacarídeos em D_2O ($30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 7), seguidas de congelamento e liofilização, com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado a oxigênio da água, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido.

4.10.1.2. Técnica de RMN Bidimensional

a) *HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy)*

Para a técnica de RMN heteronuclear HSQC, as condições de aquisição dos espectros utilizadas foram conforme descritas no manual da Bruker, onde a resolução dos espectros foi de 1024 (F2) x 512 (F1) K e janela espectral de 4085 (F2) x 15923 (F1) Hz. Através desta técnica heteronuclear foi possível determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados aos respectivos átomos de carbono (^{13}C) a partir de sinais de ^{13}C ou de ^1H conhecidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. brasiliensis*

A macroalga verde *G. brasiliensis* seca e moída (11,2 g) foi submetida a extrações aquosas sequenciais (5 g%), sendo duas extrações realizadas a 25 °C e quatro extrações a 80 °C. Após cada etapa de extração, os sobrenadantes foram tratados com etanol (3:1 v/v), centrifugados, ressolubilizados, dialisados e liofilizados, obtendo-se assim os polissacarídeos solúveis em meio aquoso.

As duas frações brutas obtidas a partir das extrações a 25 °C foram denominadas Gb1 e Gb2, sendo as quatro obtidas a 80 °C denominadas de Gb3-Gb6 (FIGURA 3). Os nomes das frações fazem referência à espécie da alga a partir da qual foram obtidas (G = *Gayralia* e b = *brasiliensis*) e ao número de extrações aos quais os resíduos foram submetidos. Foram realizadas várias etapas de extração com *G. brasiliensis* com o objetivo de se obter um maior rendimento dos polissacarídeos.

5.2. FRAÇÕES BRUTAS

5.2.1. Rendimentos e análises químicas

O rendimento individual das frações brutas de *G. brasiliensis* extraídas a 25 °C foi de 0,6% e 0,8% para Gb1 e Gb2, respectivamente. Devido ao baixo rendimento, as duas frações foram reunidas, e essa fração foi denominada Gba (1,4% de rendimento). O rendimento total das frações obtidas através das extrações a 80 °C foi de 49,6%, sendo a fração majoritária a obtida pela primeira extração a 80 °C (Gb3), com rendimento de 23,2% (TABELA 1).

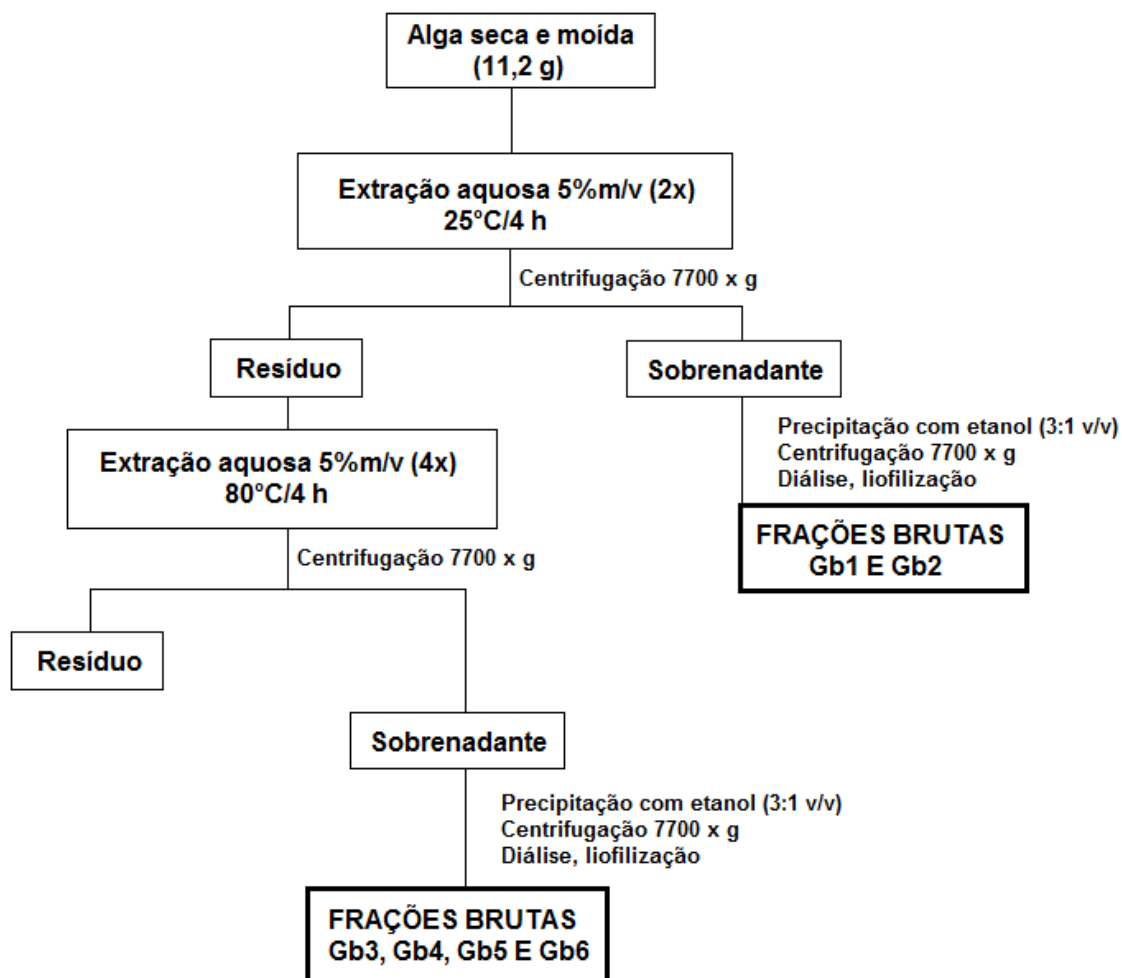


FIGURA 3 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA MACROALGA VERDE *G. brasiliensis*.

Os carboidratos totais das frações brutas de *G. brasiliensis* foram semelhantes, variando de 45,0 a 72,1%. As frações brutas apresentaram elevados teores de grupamentos sulfato de 22,3 a 31,3% e de ácidos urônicos (6,7 – 12,6%). A presença de ácidos urônicos caracteriza estes polímeros como polissacarídeos ácidos. Estes resultados foram similares aos encontrados por Cassolato e colaboradores (2008) para *G. oxysperma*, onde as frações submetidas às mesmas condições de extração apresentaram teores de sulfato de 21,2 a 30,9% e de ácidos urônicos de 12,2 e 17,0%. No entanto, os teores de proteína nas frações brutas

obtidas neste trabalho foram menores 1,9 – 3,1% em comparação com 2,0 – 8,8% encontrada por Cassolato *et al.* (2008) e similares aos resultados de Ropelatto (2011), que encontrou teores de proteína nas frações obtidas por extração a 80 °C, de 0,9 a 2,4%.

Os valores de rotação óptica específica para todas as frações brutas foram negativos: (-19,0) a (-29,2). Esta característica se deve ao fato de que as frações são constituídas majoritariamente por ramnose na configuração enantiomérica L- (TABELA 1). Estes valores são menores que os encontrados por Ropelatto (2011) e Cassolato *et al.* (2008), sendo de (-32,5) a (-37,0) e de (-24,5) a (-43,0), respectivamente.

TABELA 1 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE *G. brasiliensis*.

| Frações ^a | Rendimento ^b (%) | Açúcar total ^c (%) | Sulfato ^d (%) | Ácido Urônico ^e (%) | Proteína ^f (%) | [α] _D ^{25°} |
|----------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--|
| Gba | 1,4 | 45,0 | 22,3 | 9,8 | 2,4 | -23,4 |
| Gb3 | 23,2 | 49,8 | 25,1 | 6,7 | 1,8 | -29,2 |
| Gb4 | 11,7 | 51,5 | 26,1 | 12,4 | 2,3 | -22,6 |
| Gb5 | 9,2 | 62,3 | 31,3 | 10,3 | 1,9 | -19,0 |
| Gb6 | 4,7 | 72,1 | 29,4 | 12,6 | 3,1 | -28,0 |

^a frações obtidas por extrações aquosas: a 25 °C (Gba); a 80 °C (Gb3 - Gb6); ^b em relação à massa de alga seca e moída submetida a extração aquosa (11,2 g); ^c segundo DUBOIS *et al.*, (1956); ^d segundo DODGSON e PRICE (1962); ^e segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^f segundo LOWRY *et al.*, (1951).

5.2.2. Composição monossacarídica

Após serem submetidos ao processo de hidrólise ácida total e analisados por CG-EM na forma de acetato de alditóis, os polissacarídeos das frações brutas (Gba-Gb6) foram avaliados quanto aos constituintes monossacarídicos. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, todas as frações são constituídas majoritariamente por ramnose de 64,1 – 71,9 mol%, e menores concentrações de

glucose (13,0 – 18,5 mol%), xilose (7,3 – 12,3 mol%), galactose (2,0 – 7,0 mol%) e manose (1,2 – 2,6 mol%).

TABELA 2 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE *G. brasiliensis*.

| Frações | Monossacarídeos (mol%) ^a | | | | |
|---------|-------------------------------------|------|------|-----|-----|
| | Ram ^b | Xil | Glc | Gal | Man |
| Gba | 67,3 | 7,3 | 16,2 | 6,6 | 2,6 |
| Gb3 | 64,1 | 9,2 | 18,5 | 7,0 | 1,2 |
| Gb4 | 71,8 | 8,8 | 15,8 | 3,0 | 1,4 |
| Gb5 | 71,9 | 10,3 | 13,0 | 4,8 | - |
| Gb6 | 68,4 | 10,9 | 16,6 | 2,0 | 2,1 |

- = não detectado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b abreviatura dos monossacarídeos: Ram = ramnose; Xil = xilose; Glc = glucose; Gal = galactose e Man = manose.

A composição monossacarídica das frações brutas obtidas de diferentes espécies de algas verdes da ordem Ulvales é principalmente formada por ramnose, glucose e xilose (MAEDA *et al.*, 1991; LAHAYE; AXELOS, 1993; RAY; LAHAYE, 1995a,b; LEE *et al.*, 1998; CHEN; CHEN, 2001; CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011; LI *et al.*, 2012, CARVALHO, 2013). Os resultados de composição monossacarídica, aliados a presença de ácidos urônicos e grupos sulfato, indicam que as frações brutas obtidas de *G. brasiliensis* são constituídas por heteroramnanas sulfatadas.

5.2.3. Análises de homogeneidade

As frações Gba-Gb6 foram analisadas de cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-IR), com o objetivo de verificar a homogeneidade das frações quanto a massa molar (FIGURA 4). Um perfil polidisperso e similar entre si foi observado para

todas as frações, o que indica a presença de polímeros com diferentes massas molares.

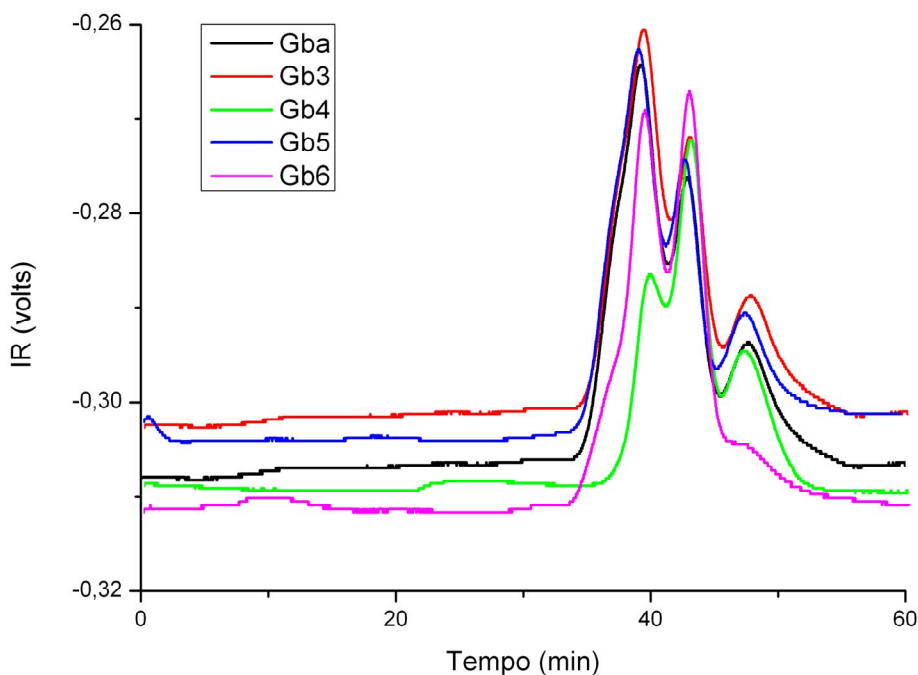


FIGURA 4 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES BRUTAS Gba, Gb3, Gb4, Gb5 E Gb6. IR = índice de refração.

5.2.4. Análises de RMN ^{13}C

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações brutas Gba e Gb3-Gb6 estão apresentados na Figura 5. Estes espectros são similares, apresentando complexa região anomérica (98,1-103,0 ppm), com sinais alargados, indicando a sobreposição dos mesmos. A presença de sinais de alta intensidade em 17,8-18,3 ppm, correspondentes aos CH_3 das unidades de ramnose, confirma os dados obtidos nas análises de composição monossacarídica (TABELA 2), onde a ramnose representa o principal monossacarídeo neutro das frações Gba e Gb3-Gb6. Apesar da baixa

intensidade, ainda é possível observar os sinais correspondentes ao C-6 das hexoses, quando estes carbonos estão livres (62,3 e 62,4 ppm) e sinais na região de 63,9-64,2 ppm e em 66,5 ppm, referentes ao C-5 de unidades de xilose 4-ligadas ou como terminais não redutores, respectivamente.

Os deslocamentos químicos observados nos espectros da Figura 5 são similares aos obtidos da macroalga verde *G. oxysperma* por Cassolato e colaboradores (2008), Ropelatto (2011) e De Carvalho (2013), indicando que as algas do gênero *Gayralia* sintetizam polissacarídeos semelhantes quanto à estrutura química.

Devido à similaridade entre a composição monossacarídica, teores de grupos sulfato e espectros de RMN ^{13}C , as frações Gb3-Gb6 foram reunidas dando origem a uma fração denominada GB (5,47 g). A fração Gba obtida a partir das duas extrações a 25 °C não foi investigada no presente estudo.

A fração GB foi submetida à cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS-IR) e apresentou um perfil polidisperso, indicando a presença de polímeros de diferentes massas molares (FIGURA 6). Esse resultado já era esperado, visto que as frações Gb3, Gb4, Gb5 e Gb6, que deram origem a fração GB, foram heterogêneas quanto as suas massas molares.

5.3. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA GB

5.3.1. Cromatografia de troca iônica

Com o objetivo de purificar os polissacarídeos presentes na fração bruta GB, essa fração foi submetida à cromatografia de troca iônica contendo DEAE-Sephacel, utilizando-se como eluentes água (GB1) e concentrações crescentes de NaCl (GB2-GB7). O rendimento e a composição química das subfrações obtidas são apresentados na Tabela 3.

O rendimento total obtido para a fração cromatografada foi de 84,9% relativa à massa polissacarídica inicial aplicada na coluna. A fração de maior rendimento, representando 36,5% de todo material recuperado, foi a eluída com NaCl 1,5 M

(GB6). Analisando a Tabela 3 nota-se, nas subfrações obtidas, elevados teores de grupos sulfato (23,3 – 29,9%), sendo todas constituídas por ácidos urônicos em diferentes percentagens (8,9 – 14,1%).

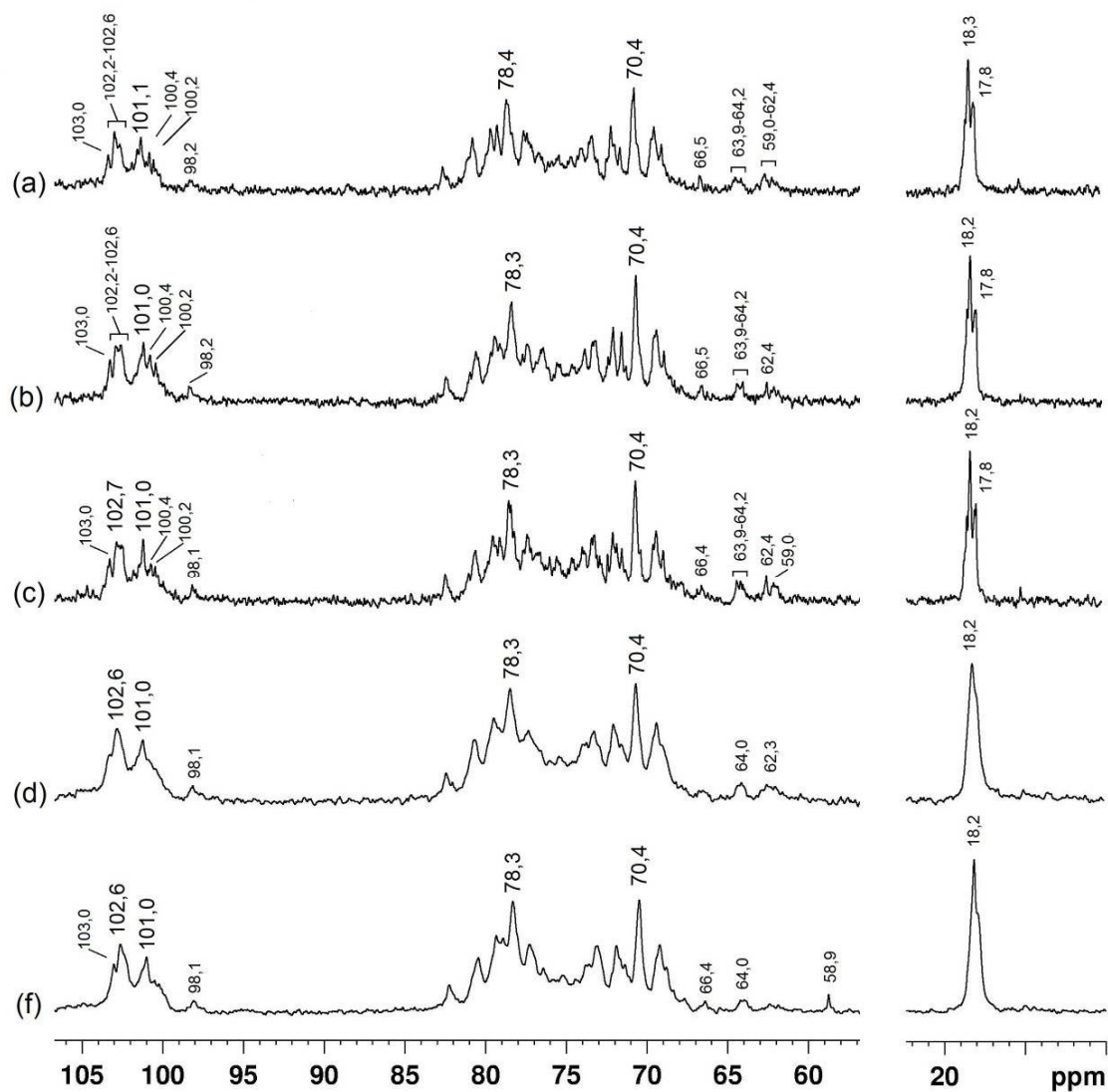


FIGURA 5 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS Gba (a), Gb3 (b), Gb4 (c), Gb5 (d) e Gb6 (f).

NOTA: Solvente D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (31,45 ppm).

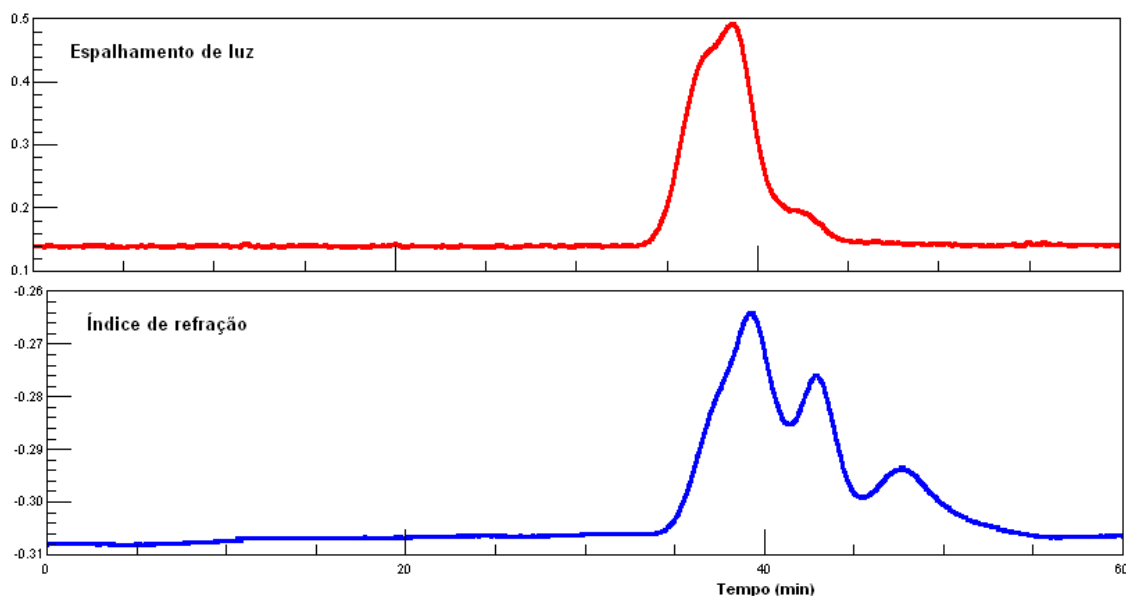


FIGURA 6 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO REUNIDA (GB).

Em termos de proteína, a fração eluída com NaCl 2 M foi a que apresentou maiores teores desse polímero (9,3% de proteína), e a fração de maior rendimento, GB6, apresentou menores teores do mesmo (2,8%).

TABELA 3 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO BRUTA GB.

| Frações ^a | Rendimento ^b (%) | Açúcar total ^c (%) | Sulfato ^d (%) | Ácido Urônico ^e (%) | Proteína ^f (%) |
|----------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| GB | - | 65,8 | 29,4 | 8,6 | 3,5 |
| GB1 (água) | 0,6 | 49,0 | 23,3 | 9,9 | 3,1 |
| GB2 (NaCl 0,25 M) | 1,0 | 52,1 | 24,9 | 12,7 | 4,1 |
| GB3 (NaCl 0,5 M) | 4,4 | 55,4 | 25,3 | 12,1 | 2,8 |
| GB4 (NaCl 0,75 M) | 5,0 | 65,3 | 28,4 | 13,0 | 8,8 |
| GB5 (NaCl 1,0 M) | 27,5 | 54,3 | 30,4 | 8,9 | 1,9 |
| GB6 (NaCl 1,5 M) | 36,5 | 65,1 | 29,9 | 14,1 | 2,8 |
| GB7 (NaCl 2,0 M) | 9,9 | 48,2 | 26,7 | 12,5 | 9,3 |

^a frações obtidas por cromatografia de troca iônica da fração GB, entre parênteses a concentração de NaCl que a fração foi eluída; ^b em relação ao material aplicado na coluna (GB = 2 g); ^c segundo DUBOIS *et al.*, (1956); ^d segundo DODGSON e PRICE (1962); ^e segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^f segundo LOWRY *et al.*, (1951).

Análises por HPSEC-MALLS-IR das subfrações GB1-GB7 demonstraram que a purificação por cromatografia de troca iônica não foi eficiente para obtenção de uma fração homogênea, em termos de massa molar. Com o objetivo de se obter uma fração com tal característica, a fração GB foi submetida à ultrafiltração em membrana.

5.3.2. Ultrafiltração em membrana

Como uma nova tentativa de se obter uma fração homogênea quanto a massa molar, a fração GB foi submetida à ultrafiltração em membrana com os seguintes limites de exclusão de 100 kDa, 300 kDa e 500 kDa. Para isso, os polissacarídeos foram solubilizados em água (0,1 g%), e após ultrafiltração se obteve os retidos e os filtrados. Somente a membrana com limite de exclusão de 300 kDa foi eficiente na separação dos polissacarídeos, sendo o material que ficou retido na membrana, nomeado de GBH (H = homogêneo), e o material eluído da membrana, nomeado GBE (E = eluído). Essas frações foram analisadas por HPSEC-MALLS-IR e os respectivos cromatogramas são apresentados nas Figuras 7 e 8 para GBH e GBE, respectivamente.

Analisando a Figura 7 verifica-se que a fração GBH foi eluída com um pico com características simétricas, indicando assim que o processo de ultrafiltração foi adequado para a obtenção de uma fração purificada. Após análise por dn/dc dessa fração, sua massa molar ponderal média foi calculada em 2.100 kDa.

As massas molares encontradas para ulvanas variam de 91 - 820 kDa (YAMAMOTO *et al.*, 1980; PARADOSSI *et al.*, 1999) e para ramnanas sulfatadas de 140 – 1.519 kDa (MAEDA *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1998; HARADA; MAEDA, 1998; ZHANG *et al.*, 2008; CASSOLATO *et al.*, 2008).

A fração GBE apresentou perfil heterogêneo (FIGURA 8) sendo então, submetida a outras metodologias de purificação (ultrafiltração em membrana de 100, 30 e 10 kDa) as quais não foram efetivas para o fracionamento dos seus polissacarídeos.

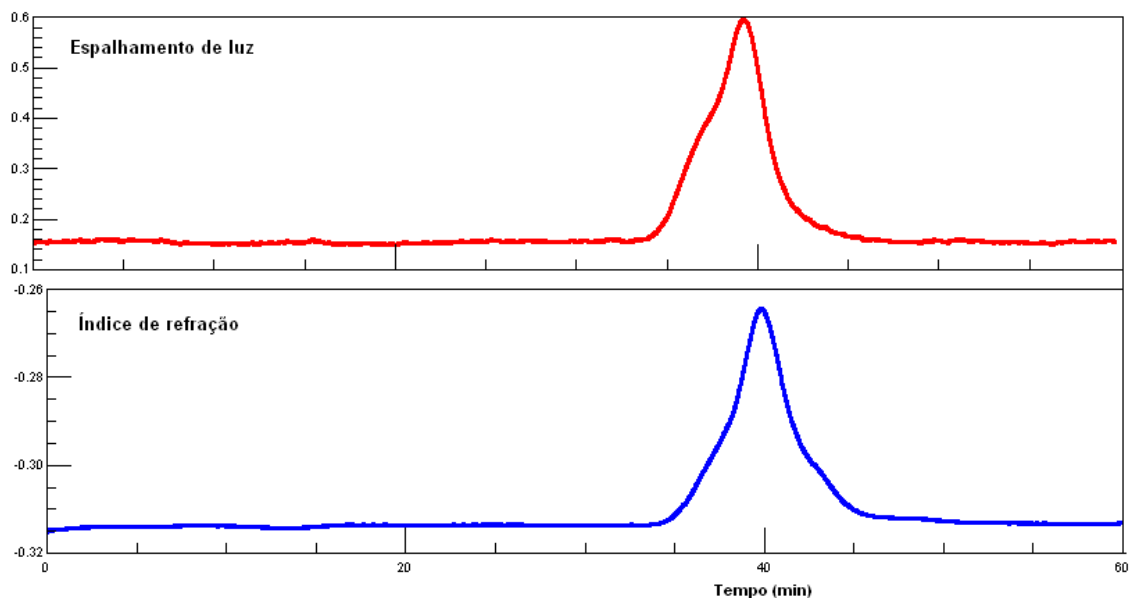


FIGURA 7 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO RETIDA NA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO DE 300 kDa (GBH).

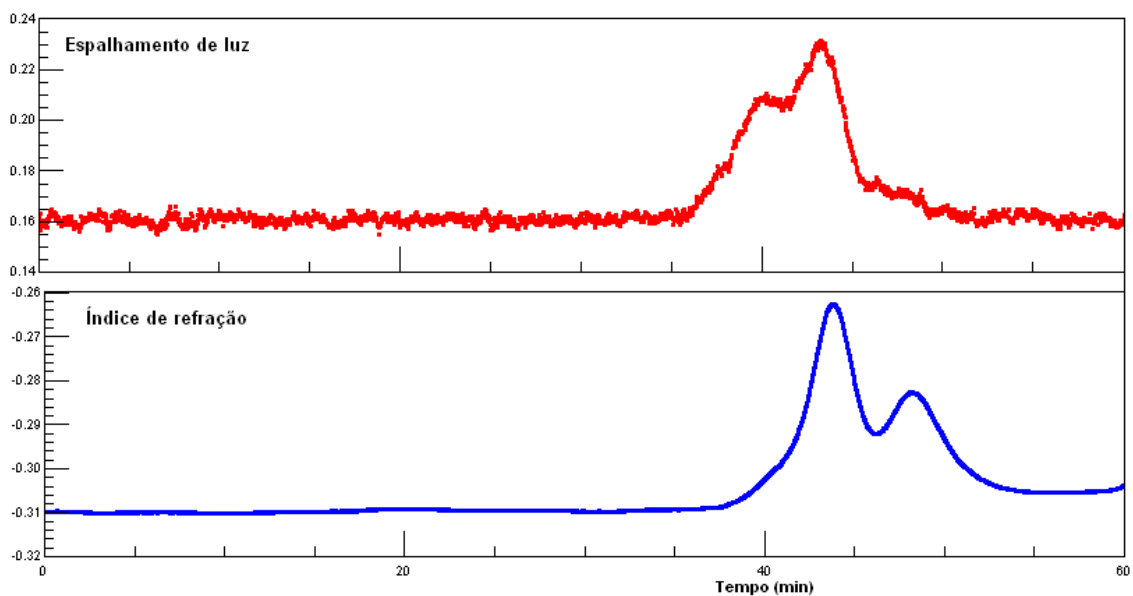


FIGURA 8 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO ELUÍDA NA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO DE 300 kDa (GBE).

Deste modo, os estudos da estrutura química dos polissacarídeos sintetizados por *G. brasiliensis* tiveram andamento com a fração GBH. A fração GBE não foi estudada quanto à estrutura química neste trabalho, no entanto, foram feitas análises químicas com esta fração para fins comparativos.

5.4. ANÁLISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO HOMOGÊNEA GBH

5.4.1. Análises químicas

As frações GBH e GBE foram submetidas a análises químicas e os resultados estão apresentados na Tabela 4. A fração GBH apresentou teores de grupos sulfato semelhante à fração GB, 29,1% e 29,4%, respectivamente. No entanto, em termos de ácidos urônicos, a fração GBE apresentou a maior concentração, 14,2%.

TABELA 4 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES GB, GBH e GBE.

| Frações | Rendimento (%) | Açúcar total ^a (%) | Sulfato ^b (%) | Ácido Urônico ^c (%) | Proteína ^d (%) | $[\alpha]_D^{25^\circ}$ |
|------------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| GB ^e | - | 65,8 | 29,4 | 8,6 | 3,5 | -41,4 |
| GBH | 72,0 ^f | 47,3 | 29,1 | 9,1 | 2,3 | -19,0 |
| GBE ^e | 28,0 ^f | 60,2 | 22,3 | 14,2 | 1,1 | -35,0 |

- = não detectado; ^a segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^b segundo DODGSON E PRICE (1962); ^c segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^d segundo LOWRY *et al.* (1951); ^e frações incluídas com fins comparativos; ^f em relação ao material recuperado após ultrafiltração. Rendimento da ultrafiltração foi de 95%.

O teor de sulfato na presente fração, GBH, é maior ao obtido para *G. oxysperma* por Cassolato *et al.*, (2008), que encontrou 25,8 % de grupos sulfato na fração polissacarídica homogênea, obtida pelos mesmos métodos de purificação. Para algas verdes do gênero *Monostroma*, teores de 6 a 31,7% de grupos sulfato

estão presentes nos polissacarídeos destas algas (MAEDA *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012).

5.4.2. Composição monossacarídica

As frações GBH e GBE foram submetidas ao processo de hidrólise total para análise de suas composições monossacarídicas, cujos resultados são apresentados na Tabela 5. A composição monossacarídica de GBH e GBE foi semelhante a da fração bruta GB. No entanto, em relação à fração GB, a fração GBH apresentou menor concentração de ramnose (64,0 mol%) e glucose = 14,5 mol%, e maiores concentrações de xilose = 14,7 mol% e galactose = 6,7 mol%. A fração GBE foi mais parecida à fração GB em relação aos teores de ramnose (67,1 mol%), galactose (3,7 mol%) e manose (2,7 mol%), e apresentou uma menor concentração de xilose (5,1 mol%) e maior teor de glucose (21,4 mol%).

TABELA 5 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES GB, GBH e GBE.

| Frações ^a | Monossacarídeos (mol%) | | | | |
|----------------------|------------------------|------|------|-----|-----|
| | Ram ^b | Xil | Glc | Gal | Man |
| GB | 67,3 | 10,3 | 16,2 | 3,6 | 2,6 |
| GBH | 64,0 | 14,7 | 14,5 | 6,7 | - |
| GBE | 67,1 | 5,1 | 21,4 | 3,7 | 2,7 |

- = não detectado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b abreviatura dos monossacarídeos: Ram = ramnose; Xil = xilose; Glc = glucose; Gal = galactose e Man = manose.

Os monossacarídeos ramnose, glucose e xilose são constituintes dos polissacarídeos de macroalgas verdes marinhas (MAEDA *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1998; CASSOLATO *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012). No entanto, para o gênero *Gayralia*, é relatada a presença de outros monossacarídeos na cadeia polissacarídica, como galactose, arabinose e manose (CASSOLATO *et al.*, 2008; NASATTO, 2012). Devido essa heterogeneidade na

composição monossacarídica, Cassolato e colaboradores (2008) denominaram os polissacarídeos sintetizados por *G. oxysperma* de heteroramnanas. Como a composição monossacarídica das frações obtidas de *G. brasiliensis* é similar à de *G. oxysperma* quanto aos monossacarídeos constituintes, neste trabalho, os polissacarídeos em estudo também serão denominados de heteroramnanas.

Para o estudo da estrutura química da heteroramnana GBH foram realizadas modificações químicas de carboxi-redução e dessulfatação nesta fração.

5.4.3. Carboxi-redução da fração GBH

A heteroramnana GBH foi submetida ao processo de carboxi-redução (TAYLOR; CONRAD, 1972) para identificação dos ácidos urônicos presentes na mesma. Neste processo, o ácido urônico presente no polissacarídeo nativo é convertido em seu respectivo açúcar neutro. Durante o processo de carboxi-redução foi utilizado o NaBD₄, onde os monossacarídeos neutros originados a partir dos ácidos urônicos se apresentam com 2 unidades de massa a mais em C-6 quando comparados aos monossacarídeos neutros pré-existentes no polímero (FIGURA 9).

Além de promover a identificação dos ácidos urônicos presentes no polímero, o processo de carboxi-redução permite uma melhor análise da estrutura do polímero, uma vez que esses monossacarídeos ácidos não permitem uma adequada derivatização e hidrólise do polissacarídeo que os contêm (BeMILLER, 1967).

Após carboxi-redução, foi realizada dosagem colorimétrica dos ácidos urônicos pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), na qual foi possível observar uma redução de 98% no teor dessas unidades monossacarídicas, sendo recuperados 59,8% do material em relação à massa inicial de GBH. A fração obtida após carboxi-redução foi nomeada pela adição da letra "R" de redução (TABELA 6).

A análise da composição monossacarídica das frações GBH e GBH-R (TABELA 7) demonstrou uma diminuição no conteúdo de galactose (6,7 → 4,1 mol%) e glucose (14,5 → 8,0 mol%). Apesar dessa diminuição, os resultados demonstram a presença de ácido galacturônico e ácido glucurônico, respectivamente, no polímero nativo. Análises por CG-EM de GBH-R demonstraram que os derivados glucitol e galactitol hexaacetato apresentaram íons com *m/z* 217 e

219. Estes fragmentos são característicos da presença de hexoses neutras e de hexoses provenientes de ácidos urônicos, respectivamente. De acordo com a porcentagem relativa destes íons, foi possível determinar que 28,7% e 48,6% do glucitol e galactitol hexaacetato foram originados a partir da carboxi-redução dos ácidos glucurônico e galacturônico, respectivamente. Deste modo a fração GBH-R contém 3,1 e 3,6 mol% de ácidos glucurônico e galacturônico, respectivamente (TABELA 7).

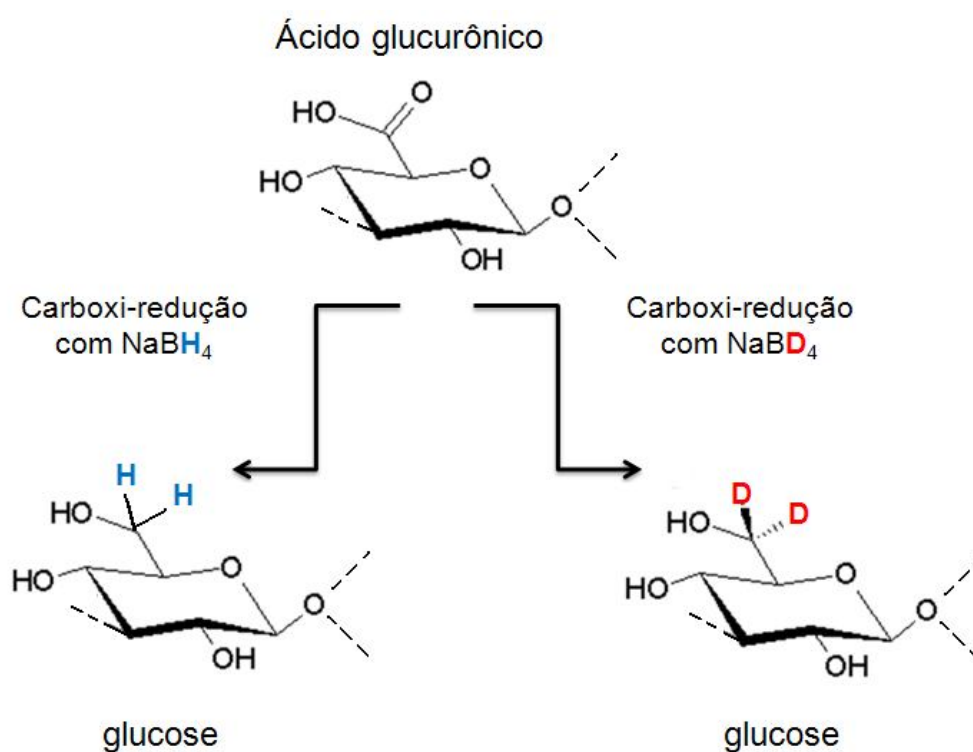


FIGURA 9 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE CARBOXI-REDUÇÃO DO ÁCIDO GLUCURÔNICO COM NaBH_4 E NaBD_4 .

Ácidos glucurônico e galacturônico são constituintes das heteroramnanas sulfatadas sintetizadas pela macroalga *G. oxysperma* (CASSOLATO *et al.*, 2008). Enquanto os polissacarídeos produzidos pelas algas dos gêneros *Ulva* e

Enteromorpha, apresentam apenas o primeiro tipo de ácido urônico (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997).

TABELA 6 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES GB, GBH, GBH-R E GBH-RD.

| Frações | Rendimento (%) | Açúcar total ^a (%) | Sulfato ^b (%) | Ácido Urônico ^c (%) | Proteína ^d (%) | $[\alpha]_D^{25}$ |
|---------------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------|
| GB ^e | - | 65,8 | 29,4 | 8,6 | 3,5 | -41,4 |
| GBH | 72,0 ^f | 47,3 | 29,1 | 9,1 | 2,3 | -19,0 |
| GBH-R | 59,8 | 49,9 | 30,1 | 0,2 | - | - |
| GBH-RD ^g | 55,1 | 71,2 | 3,1 | - | - | - |

- = não detectado; ^a segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^b segundo DODGSON E PRICE (1962); ^c segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^d segundo LOWRY *et al.* (1951); ^e fração incluída com fins comparativos; ^f em relação ao material recuperado após ultrafiltração; ^g fração GBH-R dessulfatada; Rendimento da ultrafiltração foi de 95%.

TABELA 7 – MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NAS FRAÇÕES GB, GBH, GBH-R E GBH-RD.

| Frações | Monossacarídeos (mol%) ^a | | | | | |
|---------------------|-------------------------------------|------|------|------------------|-----|------------------|
| | Ram ^b | Xil | Glc | GlcA | Gal | GalA |
| GB | 69,1 | 10,5 | 16,6 | - | 3,7 | - |
| GBH | 64,0 | 14,7 | 14,5 | - | 6,7 | - |
| GBH-R | 64,0 | 16,8 | 8,0 | 3,2 ^d | 4,1 | 3,7 ^d |
| GBH-RD ^c | 64,1 | 18,4 | 6,9 | 2,8 ^d | 3,9 | 3,7 ^d |

- = não detectado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b abreviatura dos monossacarídeos: Ram = ramnose; Xil = xilose; Glc = glucose; GlcA = glucurônico; Gal = galactose; GalA = galacturônico e Man = manose; ^c fração GBH-R dessulfatada; ^d detectados após carboxi-redução com NaBD₄ na fração GBH, portanto, não estão presentes na fração GBH-R e GBH-RD.

Com o objetivo de avaliar os tipos de ligações glicosídicas, bem como o posicionamento dos grupos sulfato, GBH-R foi dessulfatada, originando a fração GBH-RD, sendo que ambas foram submetidas ao processo de metilação.

5.4.4. Dessulfatação solvolítica da fração GBH-R

O processo de dessulfatação solvolítica de polissacarídeos sulfatados é necessário para a determinação da posição dos grupos sulfato. As análises comparativas de metilação e de RMN do polímero carboxi-reduzido e carboxi-reduzido/dessulfatado permitem identificar a localização dos grupos sulfato no polímero original, assim como os tipos de ligações glicosídicas.

Assim, GBH-R foi submetida à dessulfatação solvolítica, na forma de sal de piridínio, originando a fração GBH-RD (carboxi-reduzida/dessulfatada). Após esse processo GBH-RD apresentou 3,1% de grupos sulfato, o que correspondeu a 89,7% de dessulfatação (TABELA 6).

A composição monossacarídica de GBH-RD foi semelhante à de GBH-R (TABELA 7), indicando que a dessulfatação não ocasionou degradação desta fração. Assim, o polissacarídeo parcialmente dessulfatado foi utilizado para análises de metilação e de RMN.

5.5. ANÁLISES DE RMN DAS FRAÇÕES GBH, GBH-R E GBH-RD

As análises de RMN monodimensionais foram realizadas com as frações GB, GBH e GBH-RD e a análise de RMN bidimensional, foi conduzida com as frações GBH e GBH-RD. Nessas frações, os espectros de ^1H e ^{13}C foram parcialmente assinalados utilizando o experimento de HSQC. As referências utilizadas para comparação com os assinalamentos realizados foram de ramnanas não sulfatadas (BOCK; PEDERSEN; PEDERSEN, 1990; KNIREL *et al.*, 1998a,b; SENCHENKOVA *et al.*, 1999; OVOD *et al.*, 2004; CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011), os quais foram complementados com os deslocamentos químicos considerando os efeitos α e β da sulfatação (LAHAYE; RAY, 1996; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE; INIZAN; VIGOUROUX, 1998; CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011).

Assim como observado nas frações brutas (FIGURA 5), a fração GBH apresentou um espectro e RMN de ^{13}C complexo, com sinais alargados, o que está

de acordo com o padrão heterogêneo de glicosilação e sulfatação das unidades de ramnose, além da presença de outras unidades monossacarídicas, tais como xilose e ácidos urônicos (TABELA 8). Adicionalmente, a presença de pontos de ramificação sulfatados e não sulfatados no polissacarídeo pode resultar em um espectro com elevado grau de sobreposições. De acordo com a complexa estrutura da heteroramnana em estudo, os espectros de RMN de ^{13}C das frações GB e GBH apresentaram vários sinais na região anomérica. Os sinais entre 97,8 - 103,0 ppm são correspondentes ao C-1 das unidades de α -L-ramnose. Um sinal de baixa intensidade, em $\sim 105,0$ ppm, presente no espectro de GBH-RD foi atribuído a unidades monossacarídicas na configuração beta, como xilose, glucose, galactose e/ou ácidos urônicos. Considerando a percentagem desses monossacarídeos (TABELA 7), não é descartada a possibilidade da presença dessas hexoses, também na configuração α .

Na Figura 10 observa-se sinais de alta intensidade em 17,9, 18,4 – 17,9 e 18,2 - 17,8 ppm correspondentes ao C-6 das unidades de ramnose, de acordo com a elevada porcentagem deste 6-deoxiaçúcar nessas frações.

A configuração α -anomérica das unidades de ramnose foram determinadas a partir dos deslocamentos químicos correspondentes ao H-5 em 3,76 e 3,88 e ao C-5 em 70,4 ppm (FIGURA 10), sendo que nas unidades de ramnose β -anoméricas os deslocamentos de tais átomos encontram-se em 3,39 ppm e 72,3 - 73,4 ppm, respectivamente (BACKINOWSKY *et al.*, 1980; LIPKIND *et al.*, 1988; JANSSON, KENNE; WIDMALM, 1989; CASSOLATO *et al.*, 2008).

O espectro de RMN ^{13}C da fração carboxi-reduzida e dessulfatada (GBH-RD) se apresenta mais simplificado quando comparado aos espectros de GB e GBH. Na região anomérica, dois sinais principais em 101,9 e 103,1 ppm, correspondem as unidades de ramnose 2,3-, 2-ligadas e 3-ligadas, respectivamente (TABELA 8). Estes sinais estão de acordo com os assinalamentos realizados para heteroramnanas de *G. oxysperma* (FIGURA 10) (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO *et al.*, 2011).

No espectro de RMN de ^{13}C da fração GBH-RD, pode ser observado o sinal em 61,5 ppm. Este sinal corresponde ao C-6 livre das unidades de hexoses pré-existentes, e às originadas após carboxi-redução com NaBD_4 dos ácidos urônicos.

Destaca-se ainda, que parte deste sinal também corresponde ao reagente carbodiimida (CMC), utilizado no processo de carboxi-redução. Este reagente

apresenta sinais em 61,5 – 61,6 ppm, os quais estão sobrepostos nesses espectros aos correspondentes C-6 livres das hexoses, superestimando assim esses resultados (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011).

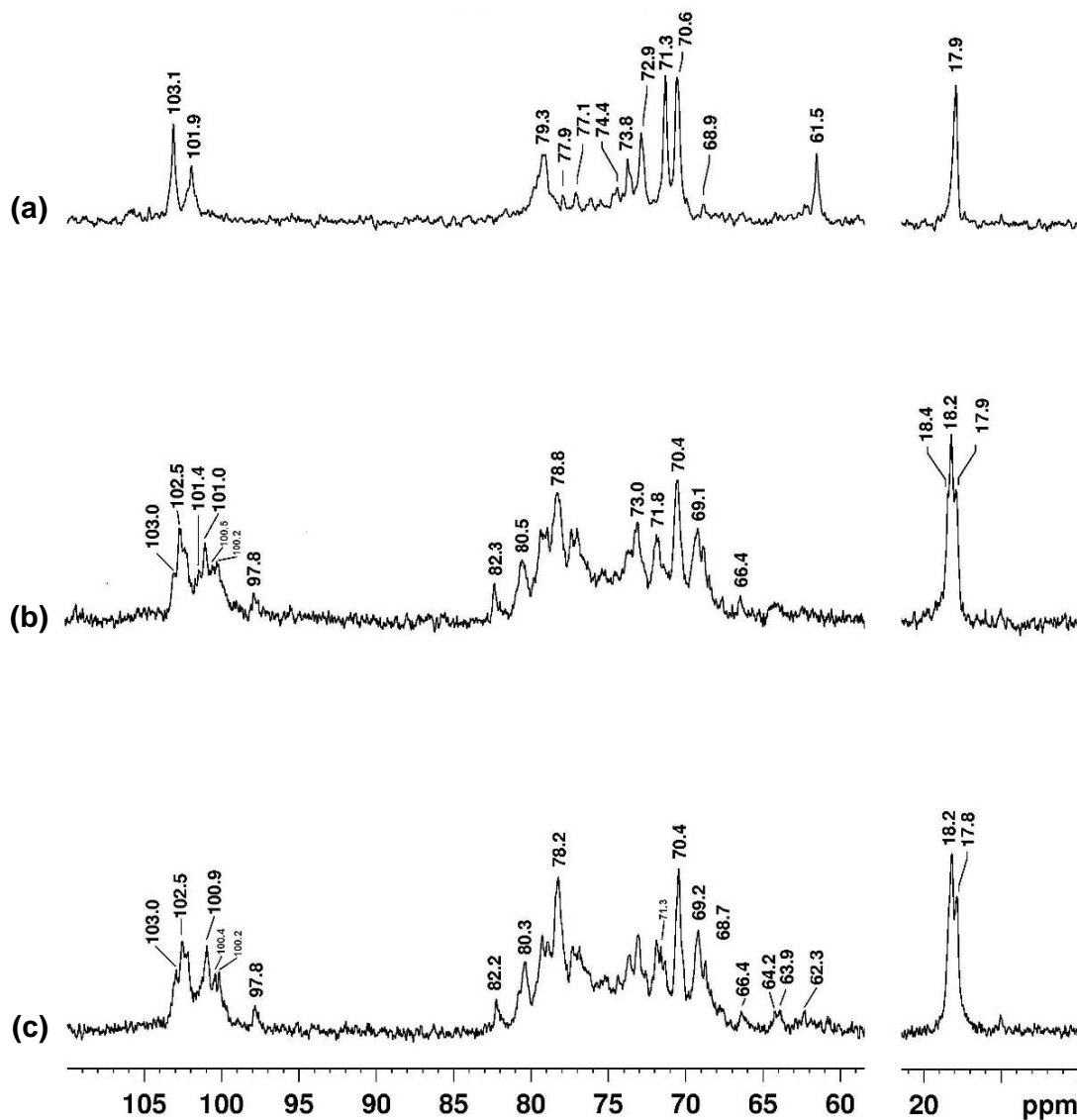


FIGURA 10 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GBH-RD (a), GBH (b) e GB (c).

NOTA: Solvente D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (31,45 ppm).

Apesar do aumento dos sinais em 61,5 ppm, referentes ao C-6 livre das hexoses após carboxi-redução (FIGURA 10a, p. 65), não se observou o sinal em 175,5 ppm, correspondente aos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos nas frações GB e GBH.

Os espectros de RMN ^1H das frações GBH-RD, GBH e GB estão apresentados na Figura 11. A fração nativa GB (FIGURA 11c) e a fração purificada GBH (FIGURA 11b) apresentaram espectros qualitativamente similares, com sinais atribuídos às unidades de α -ramnose na região de 5,03 - 5,77 e 5,03 - 5,78 ppm, respectivamente.

O espectro de RMN ^1H da fração GBH-RD apresentou na região α anomérica sinais em 4,98 e 5,06 ppm, correspondentes a unidades de ramnose 3-ligadas, e em 5,20 e 5,24 ppm, atribuídos a unidades de ramnose 2-ligadas e 2,3-substituídas, respectivamente (FIGURA 11a).

A partir do espectro de ^1H (FIGURA 11a) foi realizada a integração relativa dos sinais em 4,98, 5,06, 5,20 e 5,24 ppm em 1:1,11:1,07:0,56, respectivamente. Desta forma, a heteroramnana GBH de *G. brasiliensis* apresenta relação de unidades de ramnose 3-ligadas:2-ligadas:2,3-substituídas de 1:0,51:0,26. Para a espécie *G. oxysperma*, esta relação foi de 1:0,3:0,28. Portanto, em teores de tipos de ligações glicosídicas das unidades de ramnose, a heteroramnana GBH apresenta maior teor de ramnose 2-ligadas (29%) do que a fração Go3 (fração purificada), que apresentou 20% deste tipo de ligação.

Estes resultados foram confirmados por análise de RMN bidimensional, como descrito a seguir.

As análises de RMN bidimensionais (HSQC) foram realizadas com a fração purificada (GBH) e fração carboxi-reduzida e dessulfatada (GBH-RD) e estão apresentados na Figura 12. Os assinalamentos obtidos foram comparados com os descritos por Cassolato *et al.* (2008) e Ropelatto (2011) para a alga do mesmo gênero *G. oxysperma*.

A partir da análise de HSQC, conduzida com a fração GBH, foi possível verificar as correlações de seus átomos de C e H. Os sinais anoméricos em 100,5/5,33 ppm, 100,2/5,49 ppm e 97,8/5,77 ppm são correspondentes a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 e/ou em C-2 e C-4 (FIGURA 12a,c). O sinal na região de 78,8 ppm correlacionou com seu hidrogênio em 4,71 ppm e é correspondente ao C-2 sulfatado dessas unidades. A ausência desta correlação no

espectro de HSQC da fração GBH-RD confirma o assinalamento anterior (FIGURA 13b,d).

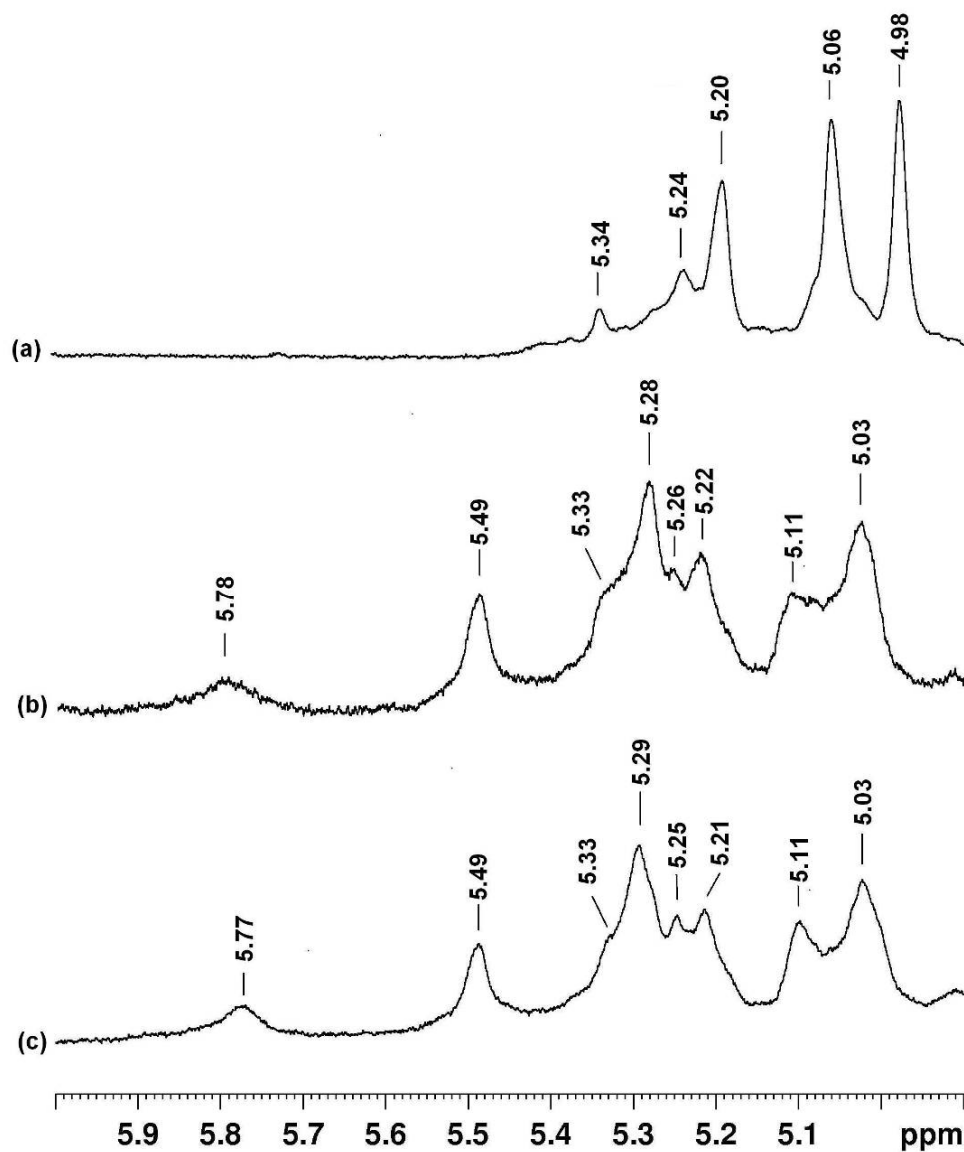


FIGURA 11 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES GBH-RD (a), GBH (b) e GB (c).

NOTA: Solvente D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (2,225 ppm).

Na fração GBH, os sinais anoméricos em 101,4/ 5,22 ppm e 101,0/5,28 ppm na fração GBH foram atribuídos a unidades de ramnose 2-ligada sulfatadas em C-4 e/ou em C-3 e C-4. Esses sinais poderiam corresponder também a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, sulfatadas ou não em C-4. Os Os sinais em 82,3 e 80,5/4,36 ppm foram atribuídos ao C-4 sulfatado das unidades de ramnose 2-ligadas 4- e 3,4-sulfatadas, respectivamente. Os sinais de C-5/H-5 encontram-se em 68,7/3,94 ppm para as unidades 2-ligadas 4-sulfatadas e em 69,1/3,91 ppm para as unidades 2-ligadas 3,4-sulfatadas.

Dando continuidade às análises da fração GBH, os sinais anoméricos em 103,0-102,5 ppm correlacionam-se com seus prótons geminais em 4,98-5,06 ppm, sendo esses sinais atribuídos a unidades de ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfatadas. Os acoplamentos dos sinais do C-2 em 71,8 ppm com H-2 em 4,17 ppm são referentes ao C-2 livre dessas unidades. As unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas apresentaram deslocamentos para C-4/H-4 em 80,5/4,36 ppm e para C-5/H-5 em 69,1/3,91 ppm. Verificando estes resultados observam-se a presença de unidades de ramnose 3- e 2-ligadas, sulfatadas em diferentes posições.

Nos espectros de HSQC da fração carboxi-reduzida e dessulfatada GBH-RD, observa-se uma simplificação dos sinais quando comparado com sua respectiva frações nativa GBH (FIGURAS 10 e 11). Na região anomérica os sinais em 101,9/5,20 ppm foram atribuídos a unidades de ramnose 2-ligadas [\rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] (FIGURA 13d) (SENCHEKOVÁ *et al.*, 1999; OVOD *et al.*, 2004; ROPELATTO, 2011). Os acoplamentos em 103,1/5,06 ppm e 103,1/4,98 ppm foram correspondentes a unidades de ramnose 3-ligadas em ambientes químicos diferentes: ligadas ao C-3 e ao C-2, respectivamente, de outras unidades de ramnose, ou seja, [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)] e [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)] (FIGURA 13a,b). Os assinalamentos realizados para estas unidades estão de acordo com dados de literatura para unidades repetitivas de ramnose presentes na cadeia O-polissacarídica do lipopolissacarídeo isolado de *Pseudomonas syringae pv. garcae* NCPPB 2708 (OVOD *et al.*, 2004), bem como, para as heteroramnanas sintetizadas por uma alga do mesmo gênero (*G. oxysperma*) descrita por Cassolato *et al.* (2008) e por Ropelatto (2011). Adicionalmente, no espectro da fração GBH-RD foi observado o acoplamento referente à tríades de ramnose 3-ligadas [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)] (FIGURA 12c), cujos C-3/H-3 apresentam deslocamentos em 79,3/3,89 ppm (OVOD *et al.*, 2004; ROPELATTO, 2011).

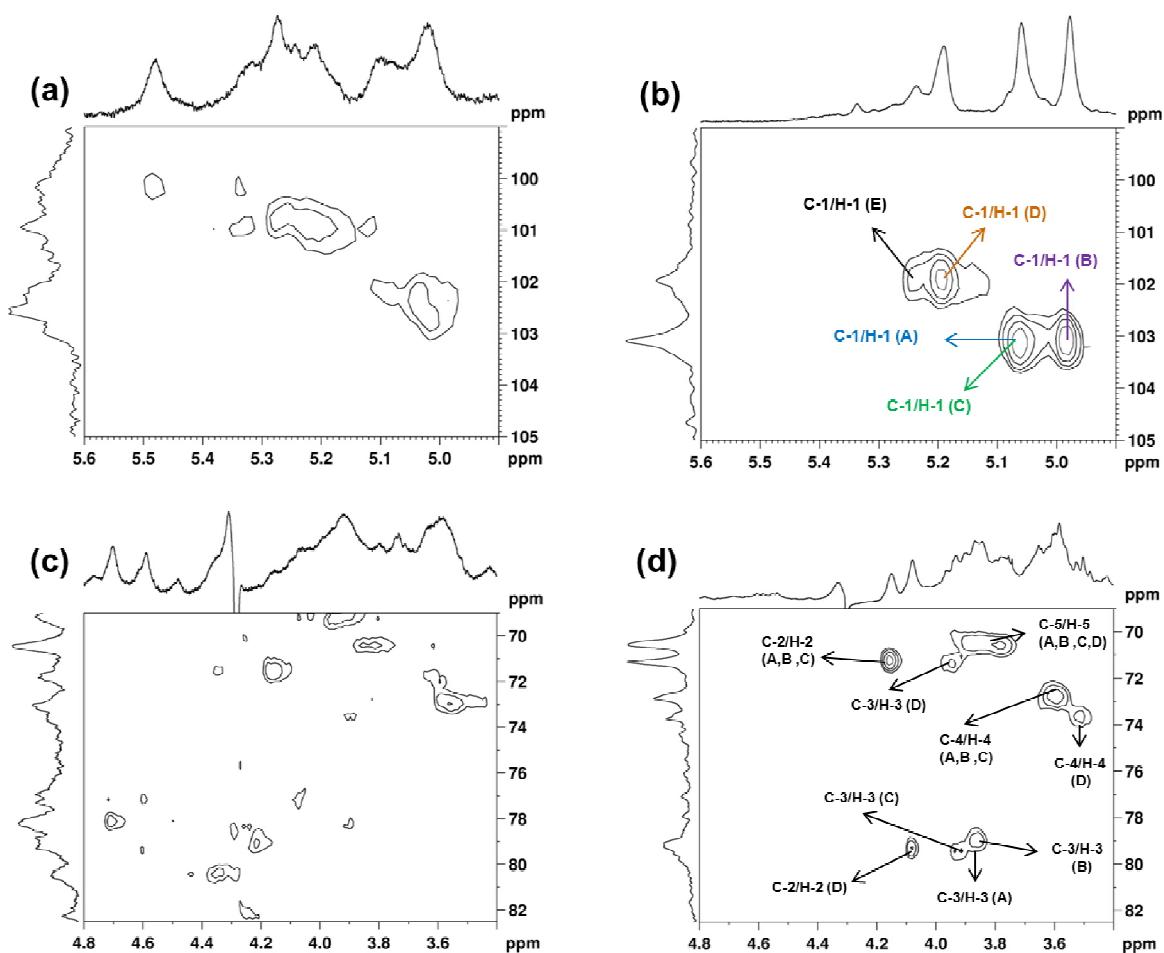


FIGURA 12 – ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES GBH (a e c) e GBH-RD (b e d). REGIÃO DO ANOMÉRICA (a e b) E REGIÃO ANEL (c e d).

NOTA: Solvente D₂O (70 °C, pH 7); acetona como padrão interno (¹³C= 31,45 ppm, ¹H= 2,225 ppm).

A = [→3)-α-L-Ramp-(1→3)]

B = [→3)-α-L-Ramp-(1→2)]

C = [→3)-α-L-Ramp-(1→3)-α-L-Ramp-(1→3)]

D = [→2)-α-L-Ramp-(1→)] (ver Figura 13).

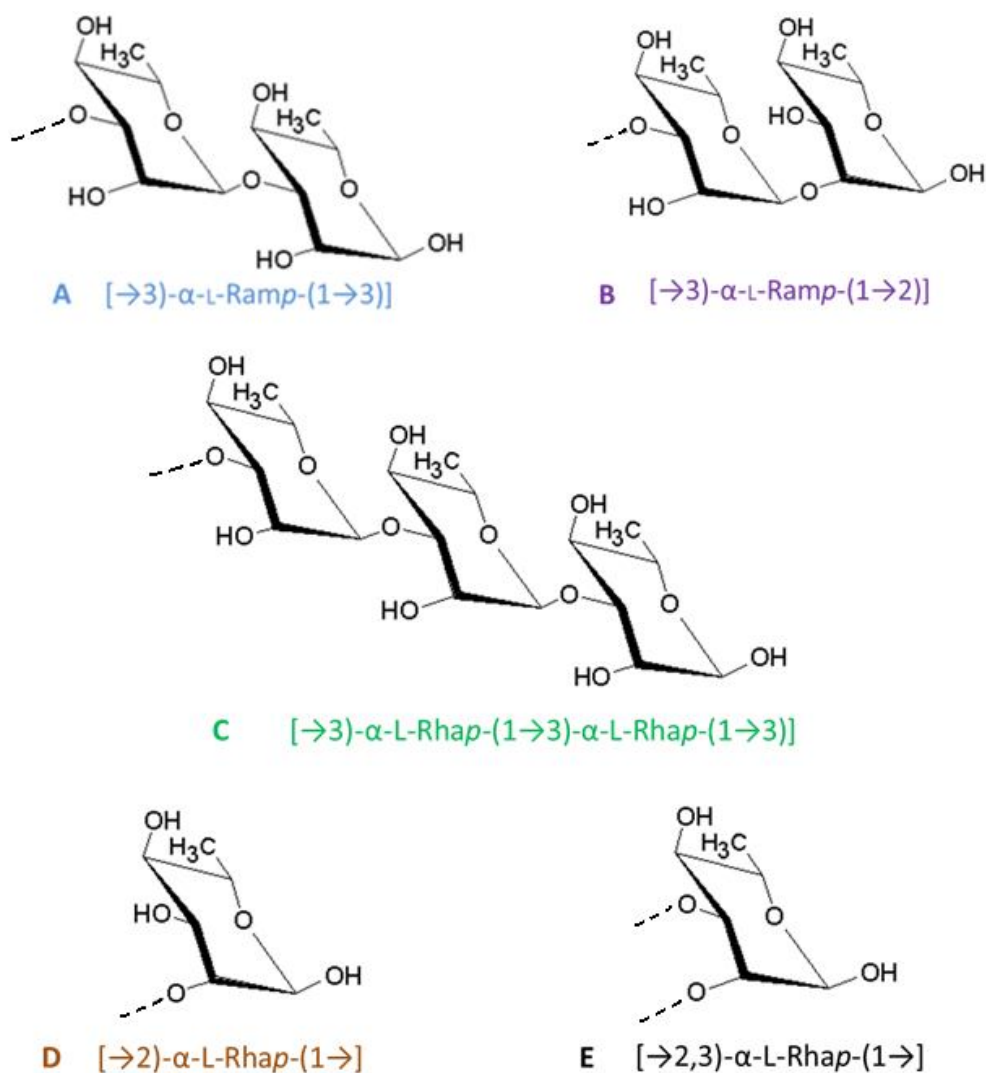


FIGURA 13 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA FRAÇÃO HOMOGÊNEA CARBOXI-REDUZIDA E DESSULFATADA (GBH-RD).

Os deslocamentos químicos da fração carboxi-reduzida e dessulfatada GBH-RD para as diferentes unidades de ramnose encontradas estão apresentados na Tabela 8.

5.6. ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES GBH-R E GBH-RD

A análise de metilação é uma das mais importantes técnicas utilizadas para a determinação da estrutura química de polissacarídeos. Devido a presença de grupos sulfato, a análises de metilação do polímero sulfatado e do correspondente polímero dessulfatado, confirma o posicionamento destes grupos substituintes, bem como, tipo de ligações glicosídicas, presença ou não de ramificações e do tipo de cadeias presentes como terminais não redutores nas cadeias laterais.

A análise de metilação da heteroramnana GBH-R foi conduzida pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Previamente a este processo, o polissacarídeo foi tratado com uma solução trietilamina para assim, se ter os polissacarídeos solúveis no solvente aprótico (DMSO), utilizado no processo de metilação. O polissacarídeo, após permetilação (como descrito no material é métodos) foi hidrolisado e os monossacarídeos liberados foram reduzidos com NaBD₄, acetilados e analisados por CG-EM. A identificação dos derivados parcialmente metilados foi realizada de acordo com o tempo de retenção e pelo padrão de fragmentação (JANSSON *et al.*, 1976).

Os resultados da análise de metilação de GBH-R estão apresentados na Tabela 9. Em relação aos derivados parcialmente metilados de ramnose, a fração GBH-R apresentou 0,6 e 8,3% de 3,4- e 2,4-Ram correspondentes as unidades de ramnose, 2- e 3-ligadas respectivamente. Uma alta percentagem de monometilados 2-Ram (13%), 4-Ram (15,1%) e 3-Ram (11,1%) foram observados. A presença de 2-Ram e 3-Ram corresponde as unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas e 2-ligadas 4-sulfatadas respectivamente, e está de acordo com as análises de RMN ¹³C de GBH-R, que mostraram a presença de sinais e 80,5 e 82,3 ppm. Estes sinais, 80,5 e 82,3 ppm, correspondem pelo menos em parte, ao C-4 de unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas e 2-ligadas 4-sulfatadas, respectivamente. O derivado 4-Ram corresponde as unidades de ramnose 2,3- substituídas e pode indicar a presença de unidades de ramnose 3-ligadas 2-sulfatadas e/ou 2-ligadas 3-sulfatadas, pontos de ramificação (2,3- substituídas), bem como, terminais não redutores de unidades de ramnose dissulfatadas.

A presença de unidades monossacarídicas não metiladas entre os produtos de metilação de um polissacarídeo pode indicar que houve submetilação. No

entanto, destaca-se que mesmo após três etapas consecutivas de metilação, a fração GBH-R apresenta percentagens similares de ramnose não metilada. Este resultado demonstra que a presença de ramnose (TABELA 9, p.74), entre os produtos de metilação da fração GBH-R não é devido à submetilação. Desta forma, a ramnose presente entre os produtos de metilação da fração GBH-R, pode ser atribuída a unidades de ramnose dissulfatadas: 2-ligadas 3,4-sulfatadas e 3-ligadas 2,4-sulfatadas. Adicionalmente, unidades de ramnose trissulfatadas (terminais não redutores) e 2,3-substituídas 4-sulfatadas também podem ser constituintes da heteroramnana GBH.

Os sinais em 80,5 e 82,3 ppm, presentes nos espectros de RMN ^{13}C de GBH-R, os quais desaparecem após dessulfatação estão de acordo com a presença de unidades 4-sulfatadas (FIGURA 10a,b, p. 65). Embora a metilação da fração GBH-R dessulfatada (GBH-RD) tenha sido conduzida, os resultados demonstraram que o teor de unidades de ramnose foi menor que o esperado (~64,0%).

Destaca-se, no entanto, que os resultados de RMN de ^1H da fração GBH-RD apresentaram sinais de alta intensidade em 4,98 e 5,06 ppm e 5,20 e 5,24 ppm, correspondentes as unidades de ramnose 3-ligadas (no C-3 e C-2 de outras unidades de ramnose) e unidades de ramnose 2-ligadas e 2,3 substituídas respectivamente. O espectro de ^{13}C desta fração também é concordante com a alta percentagem de ramnose (FIGURA 10, p. 65). Deste modo, o processo degradativo deve ter ocorrido durante a metilação, hidrólise e/ou derivatização dos produtos de hidrólise.

TABELA 8 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DA FRAÇÃO HOMOGÊNEA CARBOXI-REDUZIDA DESSULFATADA GBH-RD.

| Unidades de ramnose | Deslocamentos químicos (ppm) | | | | | | Deslocamentos químicos (ppm) | | | | | |
|--|------------------------------|------|------|------|------|------|------------------------------|------|------|------|-----------|-----------|
| | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 |
| [→3)-α-L-Rhap-(1→3)] ^a | 103,1 | 71,3 | 79,1 | 72,9 | 70,6 | 17,9 | 5,06 | 4,15 | 3,90 | 3,58 | 3,75-3,87 | 1,33 |
| [→3)-α-L-Rhap-(1→2)] ^a | 103,1 | 71,3 | 79,3 | 72,9 | 70,6 | 17,9 | 4,98 | 4,15 | 3,87 | 3,60 | 3,75-3,87 | 1,28 |
| [→3)-α-L-Rhap-(1→3)- α-L-Rhap-(1→3)] ^{a,b} | 103,1 | 71,3 | 79,5 | 72,9 | 70,6 | 17,9 | 5,06 | 4,15 | 3,90 | 3,58 | 3,75-3,87 | 1,33 |
| [→2)-α-L-Rhap-(1→)] ^a | 101,9 | 79,3 | 71,3 | 73,8 | 70,6 | 17,9 | 5,20 | 4,08 | 3,93 | 3,50 | 3,75-3,87 | 1,33 |
| [→2,3)-α-L-Rhap-(1→)] ^b | 101,9 | | | | | | 17,9 | 5,24 | | | | 1,28-1,33 |

^a de acordo com SENCHENKOVA *et al.* (1999), OVOD *et al.* (2004) e CASSOLATO *et al.* (2008); ^b de acordo com KNIREL *et al.* (1998a,b); CASSOLATO *et al.* (2008) e ROPELATTO (2011).

TABELA 9 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO GBH-R.

| Derivado ^a | Ligação | TR ^b | GBH-R |
|---|------------------|-----------------|-------|
| 2,3,4-Me ₃ -Ram ^c | Ramp-(1→ | 6:487 | 1,1 |
| 3,4-Me ₂ -Ram | →2)-Ramp-(1→ | 7:650 | 0,6 |
| 2,4-Me ₂ -Ram | →3)-Ramp-(1→ | 7:871 | 8,3 |
| 2-Me-Ram | →3,4)-Ramp-(1→ | 9:015 | 13,0 |
| 4-Me-Ram | →2,3)-Ramp-(1→ | 9:331 | 15,1 |
| 3-Me-Ram | →2,4)-Ramp-(1→ | 9:628 | 11,1 |
| Ram | →2,3,4)-Ramp-(1→ | 10:152 | 16,6 |
| <hr/> | | | |
| 2,3,4-Me ₃ -Xil | Xilp-(1→ | 6:838 | 0,2 |
| 2,3-Me ₂ -Xil | →4)-Xilp-(1→ | 8:514 | 7,9 |
| Xil | →2,3,4)-Xilp-(1→ | 11:734 | 4,6 |
| <hr/> | | | |
| 2,3,4,6-Me ₄ -Glc ^d | Glc pA-(1→ | 7:975 | 0,2 |
| 3,4,6-Me ₃ -Glc | →2)-Glc pA-(1→ | 10:639 | 0,7 |
| 2,3,6-Me ₃ -Glc | →4)-Glc pA-(1→ | 10:786 | 2,3 |
| 3,6-Me ₂ -Glc | →2,4)-Glc pA-(1→ | 13:486 | 3,3 |
| <hr/> | | | |
| 3,4,6-Me ₃ -Glc | →2)-Glc p-(1→ | 10:639 | 5,7 |
| 2,3,6-Me ₃ -Glc | →4)-Glc p-(1→ | 10:786 | 4,5 |
| <hr/> | | | |
| 2,3,4,6-Me ₄ -Gal ^d | Gal pA-(1→ | 8:375 | 0,3 |
| 3,4,6-Me ₃ -Gal | →2)-Gal pA-(1→ | 9:917 | 2,6 |
| <hr/> | | | |
| 2,3,4,6-Me ₄ -Gal | Gal p-(1→ | 8:375 | 1,2 |
| 2,3,4-Me ₃ -Gal | →6)-Gal p-(1→ | 11:987 | 0,6 |

^a mol% dos monossacarídeos quantificados na forma de alditóis acetato parcialmente metilados; ^b tempo de retenção (em min) dos derivados analisados em coluna DB-225; ^c 2,3,4-Ram analisada como: 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4-*O*-metilramnitol, etc.; ^d derivados carboxi-reduzidos analisados como os exemplos: 2,3,4,6-GlcA = 1,5-di-*O*-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-*O*-metil glucitol; 2,3,4,6-GalA = 1,5-di-*O*-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-*O*-metil galactitol, etc.

5.7. ANÁLISE DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DA FRAÇÃO GBH

Com o objetivo de se obter fragmentos com menor massa molar, 550 mg da fração GBH foi submetida ao método de degradação controlada de Smith. Após oxidação com metaperiodato de sódio ($m\text{-NaIO}_4$) e redução com NaBH_4 (~75,0% de rendimento), os polissacarídeos da GBH foram submetidos à hidrólise ácida parcial (TFA 1M) a temperatura ambiente para que ocorra a hidrólise das unidades monossacarídicas oxidadas. Os produtos desta hidrólise continham as unidades de açúcares resistentes à oxidação com $m\text{-NaIO}_4$ e apresentaram um rendimento de aproximadamente 61,5% (TABELA 10). Os produtos obtidos por degradação controlada de Smith foram denominados de GBH-S, ou seja, pela adição da letra “S” ao final do nome original (GBH). A fração GBH-S também será referida neste trabalho como “produtos de degradação controlada de Smith”.

Estudos com a fração purificada de *G. oxyspema* (Go3) descrevem que durante o processo de degradação controlada de Smith, as unidades correspondentes aos terminais não redutores de galactose, xilose e ácido glucurônico 2-sulfatado são oxidadas. Este esquema de oxidação está apresentado na Figura 14. As unidades de xilose 3-ligadas, bem como o ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado (não representados na Figura 14) e a maioria das unidades de ramnose, não são susceptíveis à oxidação (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011).

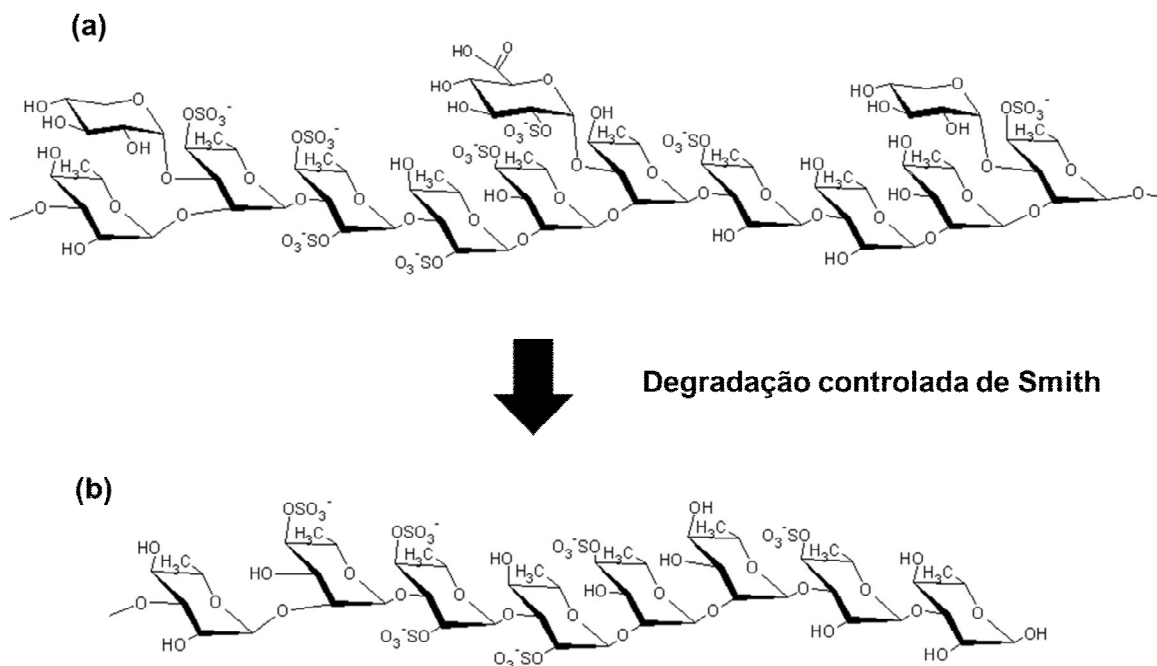


FIGURA 14 – ESTRUTURA TEÓRICA DE HETERORAMNANA SULFATADA ANTES (a) E APÓS DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (b)

FONTE: ROPELATTO (2011).

5.7.1. Análises químicas e composição monossacáridica da fração degradada de Smith (GBH-S)

Quando comparados a fração GBH os produtos de degradação controlada de Smith (GBH-S) apresentaram um aumento em relação ao teor de grupamentos sulfato (29,1 → 38,2%) e diminuição nos teores de ácidos urônicos (9,1 → 6,6%). Os teores de xilose também diminuíram (14,7 → 1,8 mol%). A oxidação total das unidades de galactose foi observada, visto que este monossacárideo não foi detectado na fração GBH-S (TABELA 10).

Em relação aos teores de glucose e ramnose, observou-se um aumento (14,5 → 18,8 mol%) e (64,0 → 74,1 mol%) respectivamente. Este aumento é devido à diminuição relativa dos outros monossacárideos. Em resumo, as unidades de xilose,

de ácidos urônicos e de galactose são susceptíveis a oxidação através do processo de degradação controlada de Smith. As unidades de ramnose 2-ligadas, constituintes da fração GBH, também são susceptíveis a oxidação com metaperiodato de sódio.

Estes resultados estão de acordo com os estudos de Cassolato e colaboradores (2008) e Ropelatto (2011). Estes pesquisadores constataram que uma fração nativa submetida ao processo de degradação controlada de Smith, possui as seguintes características: altas concentrações de ramnose, altos teores de grupos sulfato, baixos teores de ácidos urônicos e unidades de galactose e xilose completa e parcialmente oxidadas, respectivamente.

5.7.2. Análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR da fração degradada de Smith (GBH-S)

Os produtos de degradação controlada de Smith (fração GBH-S) foram submetidos à análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR. Como demonstrado na Figura 15 a fração GBH-S apresentou um perfil de eluição assimétrico indicando heterogeneidade da amostra. O tempo de eluição desta fração foi maior que o da fração polissacarídica de origem (GBH), devido a redução da massa molar dos polissacarídeos através da oxidação dos pontos de ramificação, de unidades susceptíveis a oxidação com $m\text{-NaIO}_4$. A comparação entre os perfis de eluição das frações GBH e GBH-S está apresentada na Figura 16.

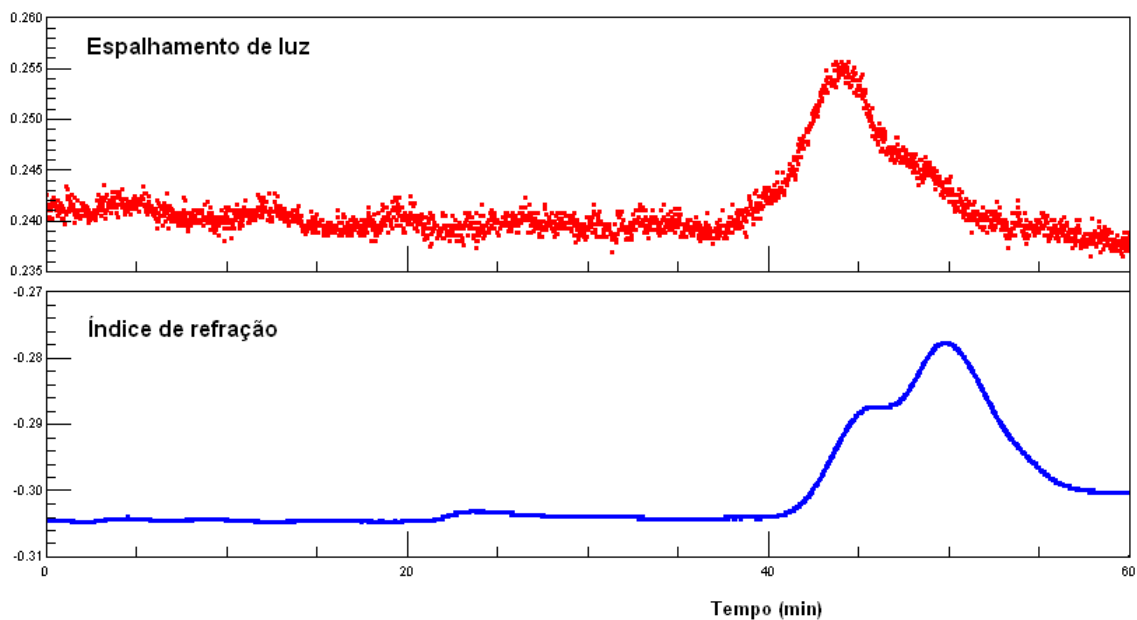


FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (GBH-S).

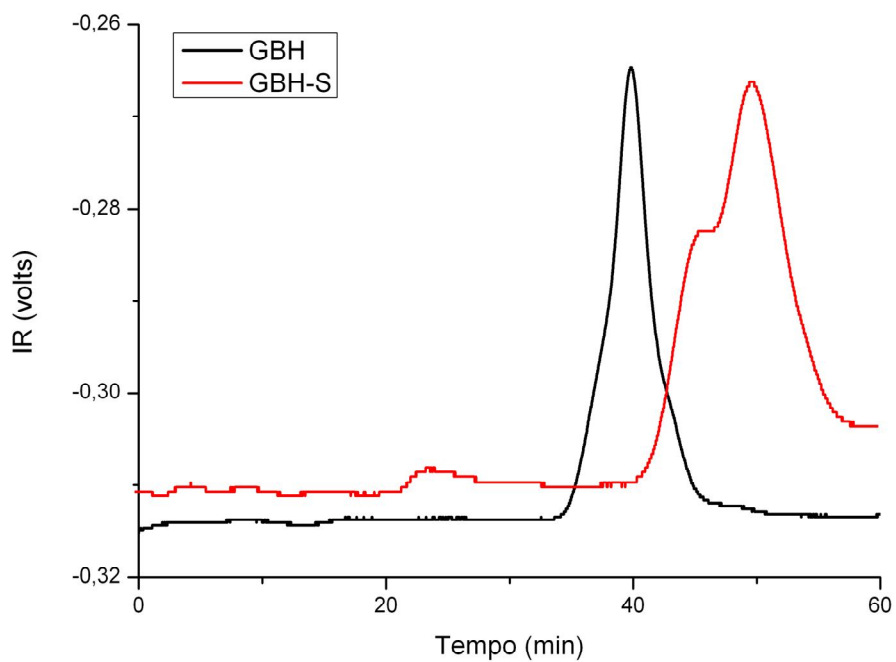


FIGURA 16 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES GBH E DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (GBH-S). IR = índice de refração.

TABELA 10 – ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (GBH-S) E FRAÇÃO GBH.

| Fração | Rendimento (%) ^a | Açúcar total (%) ^b | Sulfato (%) ^c | Ácido urônico (%) ^d | Proteína (%) ^e | [α] _D ^{25°} | Monossacarídeos (mol%) ^f | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------|------|-----|
| | | | | | | | Ram ^g | Xil | Glc | Gal |
| GBH | - | 47,3 | 29,1 | 9,1 | 2,3 | -19,0 | 64,0 | 14,7 | 14,5 | 6,7 |
| GBH-S | 61,5 | 52,2 | 38,2 | 6,6 | 1,9 | -38,3 | 78,2 | 1,9 | 19,8 | - |

- = não detectado; ^a em relação ao material submetido à degradação controlada de Smith (550 mg); ^b determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956); ^c determinado pelo método de DODGSON e PRICE (1962); ^d determinado segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^e determinado segundo LOWRY *et al.* (1951); ^f monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^g abreviatura dos monossacarídeos: Ram = ramnose; Xil = xilose; Glc = glucose; Gal = galactose; Man = manose.

5.7.3. Análise de RMN de ^{13}C e ^1H da fração degradada de Smith (GBH-S)

A fração GBH-S foi submetida à análise por RMN de ^{13}C e o espectro resultante, comparado a sua fração de origem (GBH) estão representados na Figura 17. A partir destes espectros, pode-se notar que as duas frações apresentaram espectros de RMN de ^{13}C com alta complexidade e sinais alargados devido, principalmente, ao padrão heterogêneo de sulfatação, além da presença de outros monossacarídeos além da ramnose, como xilose e ácidos urônicos. Sinais em 97,8 – 103,0 ppm (GBH) e 99,7 – 103,5 ppm (GBH-S) foram atribuídos ao carbono anomérico das unidades de α -L-ramnose (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011).

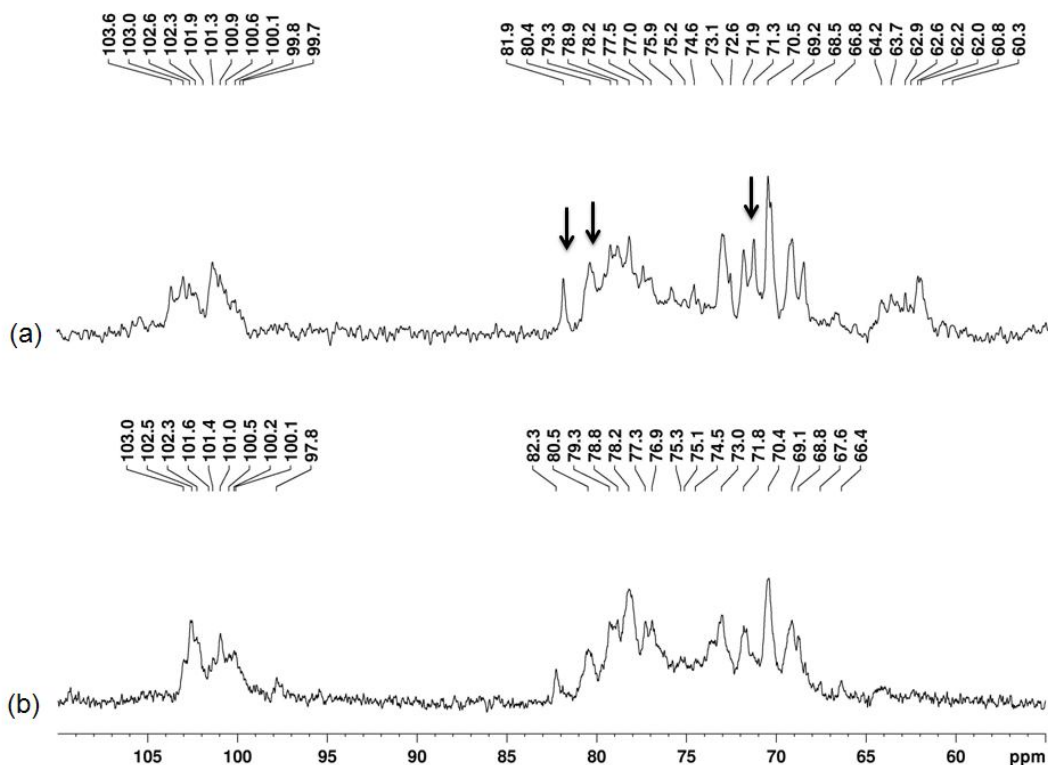


FIGURA 17 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GBH-S (a), GBH (b) DAS REGIÕES ANOMÉRICA E DO ANEL.

NOTA: Solvente D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (31,45 ppm).

Ainda na Figura 17, podem-se observar os sinais de alta intensidade em 17,9 – 18,1 ppm, correspondentes aos CH₃ das unidades de ramnose, principal monossacarídeo das duas frações (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELATTO, 2011). Em relação ao espectro de GBH-S, observa-se ainda a intensificação destes sinais (17,9 – 18,1 ppm) em relação a fração GBH, que corresponde ao aumento de ramnose após degradação controlada de Smith (não demonstrado). Os sinais em 70,5 e 70,4 ppm para GBH-S e GBH respectivamente, são referentes ao C-5 de unidades de ramnose, caracterizando a configuração α destas unidades, visto que sinais de C-5 de ramnose da configuração β são observados na faixa de 72,3 – 73,4 ppm (BACKINOWSKY *et al.*, 1980; LIPKIND *et al.*, 1988).

Nota-se também no espectro de ¹³C da fração GBH-S, o aumento do sinal em 80,4 ppm quando comparado a sua fração de origem (GBH). Este sinal corresponde ao C-4 de unidades de ramnose 2-ligadas 4-sulfatadas. O aumento do sinal em 71,3 ppm também é observado, sendo este sinal correspondente ao C-2 livre das unidades de ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfatadas. Adicionalmente, houve aumento na intensidade do sinal em 81,9 ppm que é referente as unidades de ramnose 4-sulfatadas (FIGURAS 17, setas).

Através de análise por RMN de ¹H dos produtos de degradação controlada de Smith (GBH-S) pode-se observar que o espectro apresentou sinais na região anomérica (5,04 – 5,49 ppm), sendo atribuídos ao H-1 de unidades de α -ramnose. O sinal de alta intensidade em aproximadamente 1,37 ppm foi atribuído aos hidrogênios ligados ao C-6 das unidades de ramnose (não demonstrado).

O conjunto de dados de RMN e HPSEC-MALLS-IR indica a complexidade estrutural dos produtos de degradação controlada de Smith. Desta forma, esta fração foi submetida ao processo de fracionamento por cromatografia de troca iônica a fim de se obter uma fração homogênea para os estudos estruturais.

5.7.4. Fracionamento do produto de degradação controlada de Smith (GBH-S)

Com o objetivo de fracionar os polissacarídeos de GBH-S e obter então uma fração homogênea em relação a massa molar, aproximadamente 74% da fração GBH-S (246 mg) foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna

contendo DEAE-Sephacel na forma Cl⁻. Para isto, a fração GBH-S foi solubilizada em água destilada e submetida à coluna, sendo a eluição inicial realizada com água destilada, e posteriormente as eluições realizadas com concentrações crescentes de NaCl (0,5 – 2M). As eluições foram monitoradas pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). O processo de fracionamento e a denominação das frações eluídas estão apresentados na Figura 18.

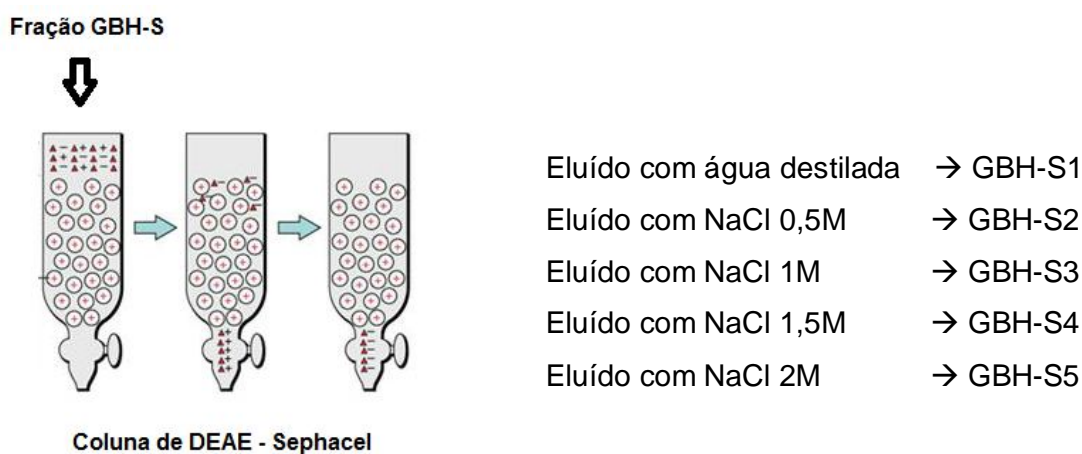


FIGURA 18 – ESQUEMA DE FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO GBH-S EM CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

NOTA: adaptado de Ropelatto (2011).

5.7.4.1. Análise de homogeneidade das frações de maior rendimento obtidas após cromatografia de troca iônica da fração GBH-S

As subfrações recuperadas da cromatografia de troca iônica foi de 80,1% relativo à massa inicial aplicada na coluna. O rendimento da fração eluída com água foi muito baixa, por isso essa fração foi descartada. As subfrações GBH-S2-GBH-S5 foram submetidas à análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR, obtendo diferentes perfis de eluição que estão apresentados na Figura 19. Todas as frações

apresentaram picos assimétricos, indicando a heterogeneidade de todas as frações em relação à massa molar. Por isso, essas frações foram designadas para estudos em outro projeto, onde outras técnicas serão realizadas para se obter uma fração homogênea.

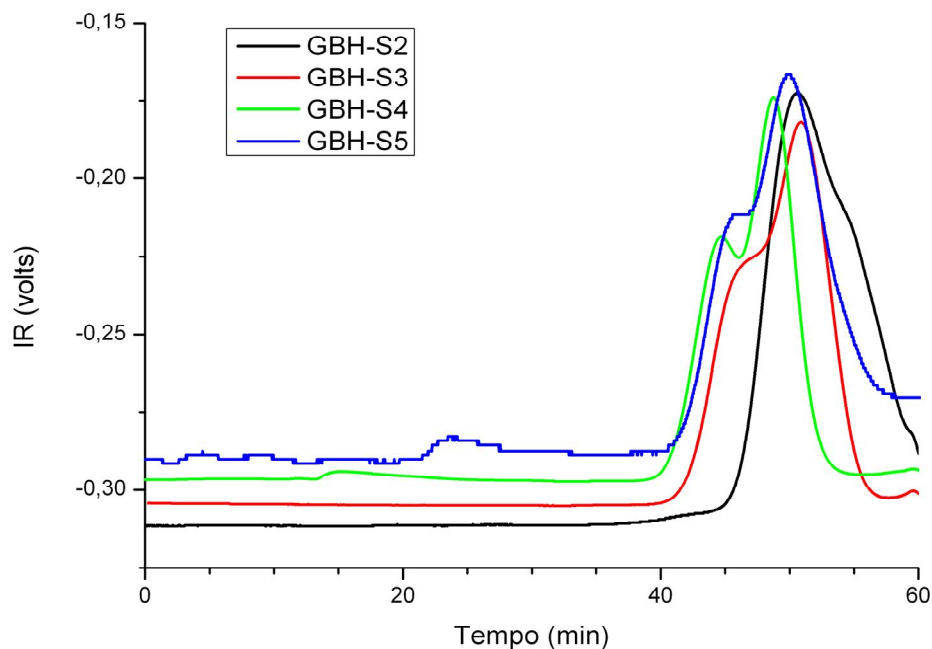


FIGURA 19 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DAS FRAÇÕES GBH-S2, GBH-S3, GBH-S4 E GBH-S5. IR = índice de refração.

A Tabela 11 apresenta o rendimento, as análises químicas e a composição monossacarídica das subfrações GBH-S2-GBH-S6. As frações de maior rendimento, GBH-S3 e GBH-S4 (24,8% e 38,6%, respectivamente) apresentaram altos teores de grupos sulfato, 35,3% e 31,2%. Em relação a composição monossacarídica, essas frações apresentaram altos teores de ramnose, 84,2% e 79,3 para GBH-S3 e GBH-S4 respectivamente.

Devido à heterogeneidade das subfrações (GBH-S2-GBH-S6) obtidas por cromatografia de troca iônica da fração degradada de Smith (GBH-S), em relação à massa molar, não foram realizados estudos químicos quanto à estrutura química

destes polissacarídeos. A purificação e os estudos químicos destas frações serão futuramente realizados.

Os estudos de atividade biológica foram conduzidos com as heteroramnanas e os produtos de degradação controlada de Smith (fração GBH-S) como discutido a seguir no Capítulo II.

TABELA 11 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO GBH-S.

| Subfração | Rendimento (%) ^a | Açúcar total (%) ^b | Sulfato (%) ^c | Ácido urônico (%) ^d | Proteína (%) ^e | [α] _D ^{25°} | Monossacarídeos (mol%) ^f | | | | |
|--------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-----|------|-----|------|
| | | | | | | | Ram ^g | Xil | Glc | Gal | Man |
| GBH-S | - | 52,2 | 38,2 | 6,6 | 1,9 | -38,3 | 74,1 | 1,8 | 18,8 | - | 5,8 |
| GBH-S2 | 6,3 | 32,2 | 35,3 | 4,2 | 0,9 | -19,8 | 84,2 | 5,2 | 7,7 | - | 4,9 |
| GBH-S3 | 24,8 | 61,3 | 35,3 | 6,2 | 1,2 | -32,1 | 79,3 | - | 15,9 | - | 4,8 |
| GBH-S4 | 38,6 | 49,4 | 31,2 | 2,2 | 2,3 | -45,7 | 91,7 | 1,9 | 2,5 | - | 3,9 |
| GBH-S5 | 10,4 | 33,2 | 21,1 | 6,9 | 2,2 | -33,0 | 77,1 | 2,0 | 10,3 | - | 10,6 |
| Total | 80,1 | | | | | | | | | | |

- = não detectado; ^a rendimento em relação à fração submetida à cromatografia de troca iônica (246 mg); ^b determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956); ^c determinado pelo método de DODGSON e PRICE (1962); ^d determinado segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^e determinado segundo LOWRY *et al.* (1951); ^f monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^g abreviatura dos monossacarídeos: Ram = ramnose, Xil = xilose, Glc = glucose, Gal = galactose, Man = manose.

CAPÍTULO II - BIOATIVIDADE DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA MACROALGA VERDE MARINHA *G. brasiliensis*

É notável o interesse dos pesquisadores na área biomédica, no sentido de isolar novos compostos bioativos obtidos de diferentes fontes marinhas. Dentre estes organismos marinhos, destacam-se as macroalgas que são fontes valiosas de polissacarídeos com estruturas inéditas, as quais apresentam diferentes atividades biológicas (HAYAKAWA *et al.*, 2000). As algas marinhas são produtoras de polissacarídeos sulfatados (PS), como por exemplo, as fucanas em algas marrons, carragenanas e agaranas em algas vermelhas e ramnanas e ulvanas em algas verdes.

Estes PS apresentam diferentes tipos de atividades biológicas com aplicação biotecnológica, como as atividades: anticoagulante, antiviral, antioxidante, antitumoral, antiangiogênica e imunomoduladora (COSTA *et al.*, 2010). Deste modo, PS obtidos de algas marinhas têm grande potencial para o desenvolvimento futuro de produtos que venham beneficiar as áreas de nutrição, de farmácia e de cosméticos (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

O Capítulo II do presente trabalho descreve a capacidade das heteroramnanas sulfatadas obtidas da macroalga verde marinha *G. brasiliensis* de atuar em sistemas biológicos como inibidoras da formação de vasos sanguíneos, especificamente nos processos de vasculogênese e angiogênese em embriões de galinha, como agente antitumoral em células de glioma, como anticoagulante e como antivirais frente aos vírus herpes simplex tipos 1 e 2.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste Capítulo foi avaliar a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados obtidos da macroalga verde marinha *Gayralia brasiliensis* e seus produtos de degradação controlada de Smith frente aos ensaios de vasculogênese e angiogênese, antitumoral, anticoagulante e antiviral.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a capacidade moduladora das heteroramnanas sulfatadas obtidas da macroalga verde marinha *G. brasiliensis* e de seus produtos de degradação controlada de Smith, sobre a vascularização de embriões de galinha;
- Avaliar a vascularização no processo de vasculogênese na membrana da vesícula vitelínica e no processo de angiogênese na membrana corioalantóica de embriões de galinha;
- Determinar a atividade antitumoral *in vitro* das heteroramnanas sulfatadas e dos produtos de degradação controlada de Smith, em células tumorais de glioma humano;
- Avaliar a atividade anti-herpética das heteroramnanas sulfatadas frente aos vírus herpes simplex tipos 1 e 2;
- Investigar a atividade anticoagulante *in vitro* das heteroramnanas sulfatadas.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

7.1. MODULAÇÃO DA FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS POR CARBOIDRATOS

Durante a embriogênese inicial, a microvasculatura é iniciada através do processo chamado de vasculogênese, e a formação de vasos a partir destes pré-existentes é um processo denominado de angiogênese (FOLKMAN, 1971). Estes processos de formação de novos vasos sanguíneos desempenham um papel importante em processos patológicos, e podem facilitar o crescimento e a metástase de tumores. Os novos vasos sanguíneos formados podem promover o crescimento do câncer, principalmente, através do suprimento de nutrientes e de oxigênio (SEOW *et al.*, 2011). Assim, a modulação desses processos é considerada uma abordagem promissora para o tratamento do câncer (HE *et al.*, 2009).

O aumento do interesse nas terapias antivasculogênica e antiangiogênica requer o desenvolvimento de novos ensaios quantitativos no crescimento de novos capilares (ADINI *et al.*, 2009). Um método eficiente e muito utilizado *in vivo* é o teste na membrana corioalantóica em embriões de galinha (*CAM-assay*). O *CAM-assay* tem se tornado uma ferramenta muito utilizada para a determinação dos ensaios antivasculogênico e antiangiogênico de muitas drogas extraídas de fontes naturais, incluindo polímeros obtidos de algas (DIAS *et al.*, 2008; SEOW *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que a diversidade e a complexidade estrutural dos carboidratos sulfatados, principalmente os teores e a disposição dos grupos sulfato e a massa molar, estão relacionados com as diversas funções exercidas por essas moléculas em sistemas biológicos (DUARTE *et al.*, 2004). Em polissacarídeos obtidos de diferentes espécies de algas, sulfatados ou não, as modificações químicas realizadas em laboratório são de suma importância, possibilitando assim o relacionamento entre a bioatividade e a estrutura química destes polímeros.

7.1.1. Formação de vasos sanguíneos e do sistema cardiovascular

O primórdio da formação de vasos sanguíneos inicia-se com o surgimento de células endoteliais a partir da diferenciação de células mesodérmicas em hemangioblastos, levando a formação das primeiras redes vasculares, denominadas de ilhotas sanguíneas (LAMALICE *et al.*, 2007). Este processo de formação de vasos sanguíneos é um dos primeiros sistemas de desenvolvimento que se estabelece durante o período embrionário a partir do mesoderma (camada germinativa intermediária do embrião). Deste modo, a partir desta vascularização inicial ocorre a formação do sistema cardiovascular, que é composto pelo coração, pelas artérias, veias e capilares (vasos sanguíneos) e pelos vasos linfáticos (TOBELEM, 1990; SWEENEY *et al.*, 1998). Os vasos sanguíneos são constituídos basicamente por uma monocamada de células endoteliais, as quais estão revestidas por moléculas de colágeno, glicoproteínas, elastinas, proteoglicanas (na matriz extracelular) e por células com a função de suporte (DIAS *et al.*, 2002).

A formação de novos vasos ocorre principalmente por dois processos distintos: vasculogênese e angiogênese (LAMALICE *et al.*, 2007) (FIGURA 20). A vasculogênese é o processo inicial da formação dos vasos e ocorre quando os hemangioblastos se diferenciam em células precursoras de células endoteliais, denominadas de angioblastos, e surgem no mesoderma da vesícula vitelínica. Após o surgimento de células endoteliais, ocorre a organização destas em agregados celulares, denominados de ilhotas sanguíneas primitivas, onde um plexo vascular primordial se estabelece. Neste processo, os canais endoteliais apresentam tamanho relativamente uniforme (DIAS *et al.*, 2002; BOUIS *et al.*, 2006). A angiogênese é o processo que procede a vasculogênese, onde ocorre o rápido crescimento vascular a partir da remodelagem dos pré-existentes. Neste processo, ocorre uma combinação de eventos de morte e regressão vascular, com a sobrevivência e ramificação de capilares a partir da vascularização primária e novos capilares surgem, onde uma rede vascular estável e complexa é definida com vasos de diferentes tamanhos, possibilitando assim, o crescimento do corpo do embrião (FOLKMAN, 1971; DIAS *et al.*, 2002).

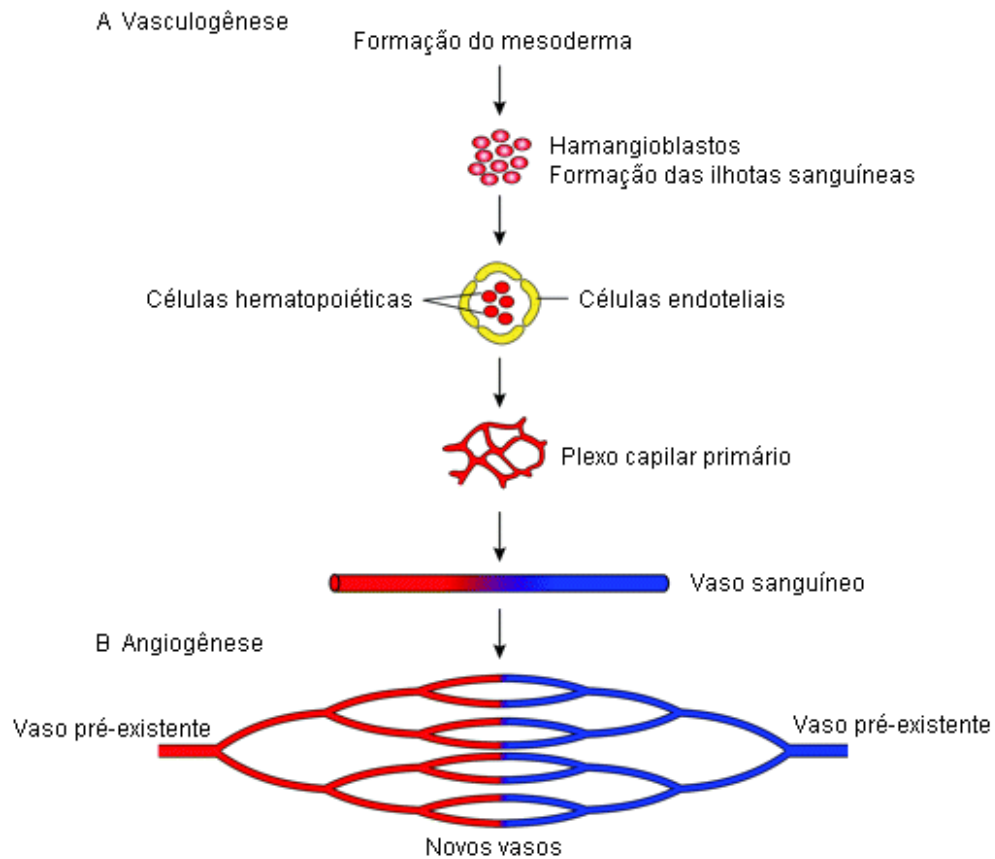


FIGURA 20 – ESQUEMA DE FORMAÇÃO DO SISTEMA VASCULAR.

(A) VASCULOGÊNESE: As células mesodérmicas se diferenciam em hemangioblastos levando a formação das ilhotas sanguíneas. Em seguida, os hemangioblastos se diferenciam em células precursoras de células endoteliais, os angioblastos. Após, ocorre a migração, diferenciação e proliferação das células endoteliais formando um plexo vascular primitivo. Finalmente, ocorre uma remodelação vascular em vasos maiores e vascularização do embrião. (B) ANGIOGÊNESE: A formação de capilares a partir dos vasos pré-existentes.

FONTE: LAMALICE *et al.* (2007).

No embrião, o desenvolvimento dos grandes vasos e do coração ocorre através da vasculogênese e a invasão de novos vasos sanguíneos mediada pela angiogênese, possibilita o desenvolvimento de órgãos como o fígado, os pulmões e o cérebro (RISAU *et al.*, 1988; ZAMMARETTIA; ZISCH, 2005).

Além de estar presente no desenvolvimento embrionário, a angiogênese permanece em muitas condições fisiológicas no indivíduo adulto, como na cicatrização, regeneração de tecidos, crescimento de cabelos e no ciclo reprodutivo feminino (DIAS *et al.*, 2002). Adicionalmente, estes processos desempenham um papel importante em condições patológicas a exemplo do câncer. Células tumorais são capazes de induzir a formação de novos capilares, através dos quais estas células podem se nutrir e se disseminar através da corrente sanguínea (FOLKMAN, 1971).

7.1.2. Sinalização celular na formação de vasos sanguíneos

O desenvolvimento de novos capilares é um processo mantido sob controle rigoroso no organismo, desta forma, a presença da angiogênese está restrita aos processos fisiológicos normais em um indivíduo adulto, como citado do item anterior (FOLKMAN; SHING, 1992). Erros de sinalização celular na regulação da angiogênese podem ocasionar a formação descontrolada de vasos, possibilitando assim o desenvolvimento de uma série de patologias como a artrite reumatóide, endometriose, glaucoma e alguns tipos de câncer (FOLKMAN; KLAGSBRUM, 1987; KOCH, 1998). Sinais angiogênicos (ativadores) e sinais angiostáticos (inibidores) são mantidos em equilíbrio nos sistemas biológicos e secretados em concentrações estritamente controladas. Quando necessário estes sinais são resgatados promovendo a inibição ou a indução de formação de novos vasos, no entanto, este sistema de regulação é imensamente complexo, e o papel desenvolvido por grande parte destas moléculas ainda é desconhecido (D'AMORE; THOMPSON, 1987; HANAHAN; FOLKMAN, 1996).

Moléculas de proteoglicanas como o sulfato de heparana estão integradas na matriz extracelular e desenvolvem participação crucial nos eventos de morfogênese e organogênese celular (DIAS *et al.*, 2002). Fatores de crescimento indutores da angiogênese, como o FGFb (*fibroblast growth factor-basic*), ficam mantidos nas moléculas de proteoglicanas que funcionam como espécie de reservatório. Quando necessários para o processo de regulação da angiogênese, estes fatores são

regatados da matriz extracelular promovendo a diferenciação de células endoteliais (TOBELEM, 1990; YANCOPOULOS *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2002).

O fator de crescimento de fibroblastos básico (FGFb) também chamado de FGF-2 é uma molécula pequena, de massa molar de 18 kDa, inespecífica para células endoteliais, no entanto, é capaz de induzir o crescimento endotelial *in vitro* e a angiogênese *in vivo* (TOBELEM, 1990; DIAS *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2008).

A família dos VEGFs (*vascular endothelial growth factors*) incluem os cinco fatores de crescimento derivados da placenta: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E. Em humanos, monômeros de VEGF-A existem como cinco isoformas diferentes, sendo o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) o mais ativo e abundante. Este fator de crescimento é responsável por regular as funções nas células endoteliais, é um potente indutor da angiogênese regulando as principais etapas do processo angiogênico como a diferenciação, proliferação e migração celular (LAMALICE *et al.*, 2007). Além da família dos VEGFs, existem outros fatores específicos para a formação de vasos sanguíneos, como os quatro fatores angiogênicos pertencentes à família Ang (angiopoietinas): Ang-1, Ang-2, Ang-3 e Ang-4, que atuam induzindo a angiogênese de maneira parácrina e pelo menos um membro da família das Eph (efrinas A1, B1 e B2) (DIAS *et al.*, 2002).

As principais funções dos fatores angiogênicos mais estudados, o FGFb e o VEGF seriam a atuação sobre as células endoteliais, levando à ativação de enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMPs) e a ativação de plasminógenos. Essas funções são essenciais no mecanismo de migração celular, no processo de formação do tubo vascular (YANCOPOULOS *et al.*, 2000; BERTI, 2008).

A ativação de MMPs está ligada ao bloqueio dos seus inibidores teciduais, os TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) e que a redução da síntese destes MMPs desencadeia uma atividade proteolítica na matriz extracelular. No início da angiogênese, este processo permite que as células endoteliais migrem através do tecido conjuntivo e no final da formação dos vasos, ocorre a estabilização da matriz extracelular endotelial, nesta etapa a expressão de MMPs é reduzida e os TIMPs são induzidos (CORNELIUS *et al.*, 1995).

Além do FGFb, outros fatores de crescimento não específicos para as células endoteliais estão envolvidos na formação de vasos sanguíneos, a exemplo do PDGF (*platelet-derived growth factor*), fator de crescimento derivado de plaquetas e de fatores de transição (YANCOPOULOS *et al.*, 2000).

Dentre o complexo jogo de sinalização celular que promove a formação de novos vasos sanguíneos maduros, os receptores de membrana celular trabalham possibilitando que estes fatores angiogênicos atuem de forma integrada. Os VEGFs são ativos mediante sua ligação com os seus respectivos receptores de membrana VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Estes receptores de membrana são expressos na sua maioria, pelas células endoteliais presentes nos vasos sanguíneos e pelas células endoteliais linfáticas. Juntamente com os receptores de Ang (Tie1, Tie2, Tie3 e Tie 4) os VEGFRs desempenham papel importante na angiogênese em relação a enzima tirosina quinase, cuja a ativação faz com que estes receptores se organizem em dímeros (GALE; YANCOPOULOS, 1999; DIAS *et al.*, 2002).

7.1.3. Vascularização e o desenvolvimento de tumores

Células cancerígenas presentes em tumores primários são capazes de migrar através da corrente sanguínea. Esta capacidade se dá através da comunicação entre células tumorais e células estromais (ligadas às células tumorais). Dando início a invasão e se disseminando para outras partes do organismo, a partir da indução da formação de novos vasos, promovendo assim a metástase (HENDRIX *et al.*, 2011), como ilustrado na Figura 21.

O comportamento da angiogênese relacionada à vascularização de tumores foi estudado por Folkman (1971), que descreveu o estado de dormência do tumor frente à ausência de vascularização. O processo de angiogênese descontrolado favorece o crescimento da massa tumoral e o desenvolvimento metastático. Se o suprimento nutricional de células tumorais é facilitado pela formação de novos vasos sanguíneos, o tumor cresce desordenadamente. Em condições em que há ausência da vascularização, o tumor não se desenvolve, atingindo apenas alguns milímetros (CARMELIET; JAIN, 2000; BERGERS; BENJAMIN, 2003).

A capacidade apresentada por alguns tumores malignos de se desenvolver e colonizar outros órgãos através da metástase está relacionada à sua capacidade de produzir moléculas indutoras da neovascularização. Essa capacidade é atribuída às modificações genéticas que ocorrem durante o processo de transformação de células normais em células cancerígenas, onde a maquinaria da célula neoplásica se torna

capaz de sintetizar estes indutores angiogênicos (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; KOCH, 1998, CARMELIET; JAIN, 2000). Neste sentido, a biologia da vascularização durante a embriogênese é relevante também durante o processo de formação de tumores (FOLKMAN, 2001; HENDRIX *et al.*, 2003).

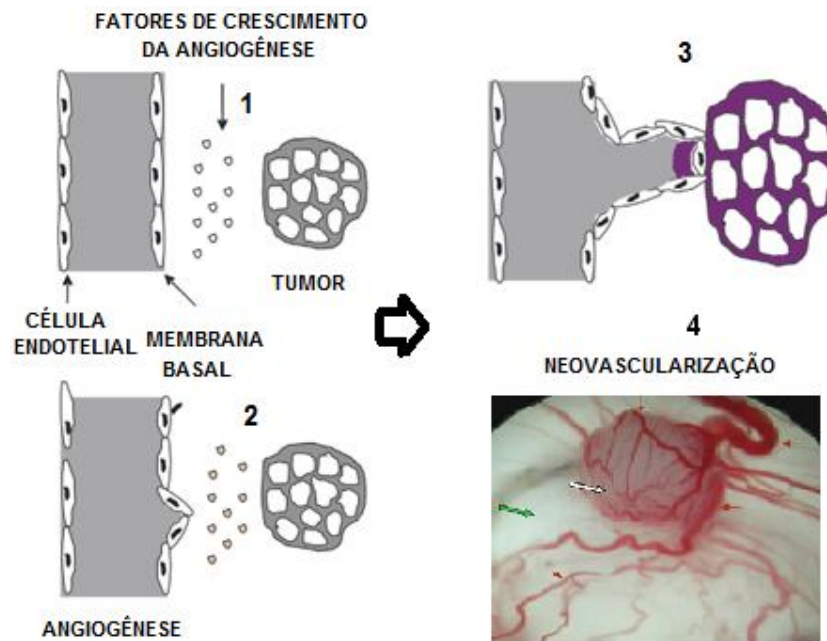


FIGURA 21 - PROCESSO DE ANGIOGÊNESE NO CRESCIMENTO DE TUMORES.

(1) – Células tumorais desenvolvem a capacidade de secretar fatores angiogênicos, (2) – Células do endotélio são induzidas à migração e proliferação, e um novo vaso sanguíneo é formado e, (3) – A massa tumoral é aumentada pelo suprimento de nutrientes e oxigênio a partir do novo vaso formado (HENDRIX *et al.*, 2011), (4) Figura ilustrando um tumor (seta branca) resultante de células humanas cultivadas na membrana corioalantóica de embriões de galinha (seta verde), onde os vasos sanguíneos com diferentes diâmetros a partir da membrana são atraídos pelo tumor que requer essa vascularização para crescerem (<http://www.fondation-ritc.net/Microenvironnement-tumoral-.html?lang=en/>Acesso: 04 de maio de 2013).

Outro ponto importante na vascularização fisiopatológica é que nesta condição o crescimento vascular se apresenta constante e desordenado nunca alcançando a estabilidade. Além disso, o fluxo sanguíneo é caracterizado por ser lento e oscilante, ocasionando o extravasamento do conteúdo plasmático a exemplo das proteínas do

plasma Ao contrário, na angiogênese fisiológica, a formação de vasos sanguíneos é mantida sob rígido controle, onde os capilares rapidamente sofrem maturação e se tornam estáveis. Estudos revelaram que o fator de crescimento FGFb é sintetizado por diversas linhagens de células tumorais e pode ser expresso em altas taxas e de forma seletiva (GAGLIARDI; COLLINS, 1993; BERGERES, HANAHAN e COUSSENS, 1998; MUNDHENKE *et al.*, 2002).

A presença da neovascularização fisiopatológica não se limita à vascularização tumoral, podendo ser encontrada em outros tipos de patologias desprovidas de malignidade (FOLKMAN; KLASBRUM, 1987; FOLKMAN, 2001), como a retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, nova vascularização ocorrida na córnea transplantada, glaucoma neovascular, tracoma, psoríase, desenvolvimento de placa aterosclerótica, angiofibroma e malformações artero-venosas.

Além de ser fundamental durante a embriogênese, o processo de formação de vasos sanguíneos pode se apresentar na vida adulta em condições fisiológicas normais e em condições fisiopatológicas, a exemplo dos tumores malignos. Deste modo, estudos no sentido de bloquear a neovascularização fisiopatológica são importantes e muitas pesquisas revelaram que substâncias obtidas de fontes naturais são capazes de interferir neste processo de formação de novos vasos, podendo atuar como compostos antiangiogênicos. A respeito de serem moléculas valiosas em relação à bioatividade, polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas também são descritos por apresentarem atividade sobre a vascularização, tanto em modelos animais (*in vivo*) ou através de técnicas de cultivo celular (*in vitro*) (SOEDA *et al.*, 2000; BÜRGERMEISTER *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2008).

7.1.4. Modulação da vascularização por polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeos sulfatados como pentosana polisulfato, heparina, sulfato de heparana, sulfato de dextrana e sulfato de condroitina são descritos por estimular a formação do tubo vascular, e os polissacarídeos não sulfatados como xilanas e dextranas não sulfatadas não exibem este efeito indutor (JACKSON *et al.*, 1994). De

fato, proteoglicanas sulfatadas endógenas são essenciais para o transporte de FGFb e ativação do seu receptor, devido à estabilização de um complexo entre FGFb e seu receptor com cadeias distintas de espécies de sulfato de heparana (GALLAGHER, 1994). No entanto, dependendo da estrutura química, certos polissacarídeos sulfatados podem sequestrar o FGFb, prevenindo desta forma, a ativação dos seus receptores (FGFRs), inibindo então, a formação do tubo vascular, tanto na vascularização inicial (vasculogênese), quanto na vascularização a partir de vasos pré-existentes (angiogênese) (DIAS *et al.*, 2008).

Se um polissacarídeo é capaz de exibir propriedade pró-angiogênica ou antiangiogênica, essa capacidade moduladora parece estar ligada, principalmente, ao teor e posição dos grupos sulfato e a massa molar deste polímero (BÜRGERMEISTER *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2008). Assim, a atividade angiogênica de fucanas sulfatadas nativas, que possuem um grau de sulfatação, pode ser revertida em ação antiangiogênica, quando, através de modificações químicas, o grau de sulfatação da molécula é aumentado (SOEDA *et al.*, 2000; MATOU *et al.*, 2002). Outros polissacarídeos altamente polianiônicos como a suramina polisulfonada e seus análogos, também podem inibir significativamente a angiogênese através da prevenção da ligação de FGFb, TGF- β (*transforming growth factor-beta*) e EGF aos seus respectivos receptores (COFFEY *et al.*, 1987; YAYON e KLAGSBRUM, 1990; PESENTI *et al.*, 1992; GAGLIARDI, 1992).

Estudos prévios têm demonstrado que galactanas de baixa massa molar, obtidas através de hidrólise parcial de arabino-galactanas, de *Larix decidua*, após sulfatação química, são potentes inibidoras angiogênicas em embriões de *G. domesticus* (BÜRGERMEISTER *et al.*, 2002). Oligossacarídeos altamente sulfatados, obtidos de λ -carragenanas por despolimerização, também são potentes inibidores angiogênicos (50% de inibição, 200 μ g) (CHEN *et al.*, 2007).

Dias e colaboradores (2005), observaram inibição de 64% da angiogênese em embriões de galinha (CAM-assay), utilizando uma concentração de 1500 μ g de fucanas sulfatadas nativas extraídas da alga marinha *Sargassum stenophyllum*. E mais recentemente, através do ensaio na membrana da vesícula vitelínica (vasculogênese), observaram uma inibição de 100% da formação dos vasos sanguíneos, quando se utilizou a mesma concentração (1500 μ g) de fucanas obtidas da mesma alga (DIAS *et al.*, 2008).

Levando em consideração a necessidade de novos agentes naturais que apresentem a capacidade de modular a vascularização patológica de diversas doenças, incluindo a vascularização tumoral, heteroramnanas sulfatadas isoladas de macroalgas verdes marinhas, particularmente as obtidas de espécies do gênero *Gayralia*, são promissoras como agentes antiangiogênicos.

Estes polissacarídeos sulfatados poderiam atuar impedindo a nutrição e a oxigenação de células neoplásicas em tumores sólidos, bem como a promoção da metástase através da neovascularização fisiopatológica. Desta forma, poderiam também ser empregados como antiangiogênicos no tratamento de outras doenças decorrentes da neovascularização fisiopatológica. Ademais, a obtenção e purificação destes polissacarídeos são etapas simples, de baixo custo e apresentam altos rendimentos. Além disso, vale destacar que estes compostos obtidos de macroalgas verdes marinhas, não são tóxicos quando aplicados em modelos animais.

7.1.5. Modelo experimental *in vivo* (embriões de *Gallus domesticus*)

Nos estudos de vascularização diversas técnicas utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidas, através das quais se avalia a resposta de moléculas naturais frente à angiogênese e à vasculogênese (FOLKMAN, 1971; BYRD e GRABEL, 2004; DIAS *et al.*, 2008). Uma das técnicas utilizando modelos *in vivo*, é a realizada em vasos axilares de zebrafish e na membrana do saco vitelínico de embriões e de indivíduos adultos de camundongo (BYRD; GRABEL, 2004). Outros métodos *in vivo* incluem a microcirurgia corneal e o ensaio clássico realizado na membrana corioalantóica em embriões de aves, conhecido como *CAM-assay* (FOLKMAN, 1971; ZYGMUNT *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2008).

Na técnica clássica de *CAM-assay* utilizando embriões de galinha, as injeções são aplicadas na membrana corioalantóica, onde é avaliado o processo de angiogênese (FOLKMAN, 1971). Dias e colaboradores (2008) aperfeiçoaram esta técnica e realizaram o ensaio na membrana da vesícula vitelínica (MV) destes embriões, desta forma, foi possível avaliar a vascularização no processo de vasculogênese. O ensaio na MV facilita os estudos laboratoriais, visto que este ensaio pode ser realizado em embriões com apenas 24 horas de desenvolvimento.

Ademais, nesta etapa inicial, os embriões ainda são pequenos e não apresentam movimentação e um corpo totalmente estruturado, o que dificulta a visualização dos vasos durante as análises.

Nos ensaios de vasculogênese e angiogênese, as substâncias a serem depositadas nas membranas da vesícula vitelínica e corioalantóica, respectivamente, são inicialmente adsorvidas em suportes que são geralmente feitos de colágeno, metilcelulose, poliestireno e dextrana (OPPENHEIM; LEVIN; HARTH, 1973; GAGLIARDI; COLLINS, 1993; DORDUNOO *et al.*, 1995; IRUELA-ARISPE *et al.*, 1995; SHIBLEY; PENNINGTON, 1998; DIAS *et al.*, 2008).

Os estudos de vascularização realizados através dos ensaios da MV e da membrana corioalantóica (MC) são vantajosos quando comparados às demais técnicas utilizadas em laboratório com este mesmo propósito. O processo de incubação dos ovos em chocadeiras é simples, de baixo custo e que oferece a possibilidade de manipular um número racional de unidades amostrais (SCHOENWOLF, 1994; CAMPESTRINI, 2007).

A espécie *Gallus domesticus* está amplamente documentada em relação à genética, à fisiologia e à embriologia, o que facilita a utilização dos embriões desta espécie como modelo biológico. Os embriões se caracterizam pelo desenvolvimento em um ambiente próprio, independentes de placenta e de influência materna. Outra característica relevante destes embriões é o rápido surgimento de uma vascularização primitiva de fácil visualização, onde em um curto período de desenvolvimento, (aproximadamente 24 horas de incubação) os tratamentos já podem ser realizados (MOURY; SCHOENWOLF, 1995).

Nos embriões de *G. domesticus*, as ilhotas sanguíneas que são os primeiros indícios de vascularização (processo de vasculogênese) podem ser observadas em um período de 24 horas de incubação (EYAL-GILADI, 1991). Essas estruturas da vascularização primitiva podem ser observadas nas bordas do blastômero (camada germinativa de desenvolvimento do embrião) e são formadas a partir de agregados de células endoteliais, originadas no mesoderma extra-embriônico (camada germinativa intermediária do embrião). Para formarem os primeiros vasos sanguíneos, as ilhotas sanguíneas passam por um processo de associação (anastomose) e atingem a luz vascular o que caracteriza o aparecimento de uma estrutura capilar. Este processo acontece entre 26 e 29 horas de desenvolvimento (estádio 8) (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; AREY, 1974).

Na sequência, no tempo de incubação de aproximadamente 33 horas, forma-se uma rede vascular em que os vasos se conectam limitados pelo vaso sino terminal. Essa rede primitiva de capilares é denominada de plexo vascular e está associada ao endoderma subjacente envolvendo uma parte do vitelo do ovo (FIGURA 22), onde desta forma, a vesícula vitelínica é organizada em anexo ao embrião. Nesta etapa também ocorre a formação do coração que estabelece uma circulação sanguínea com as artérias e veias onfalomesentéricas presentes neste anexo embrionário (PATTEN, 1951; HAMBURGER; HAMINTON, 1951; HOUILLON, 1972).

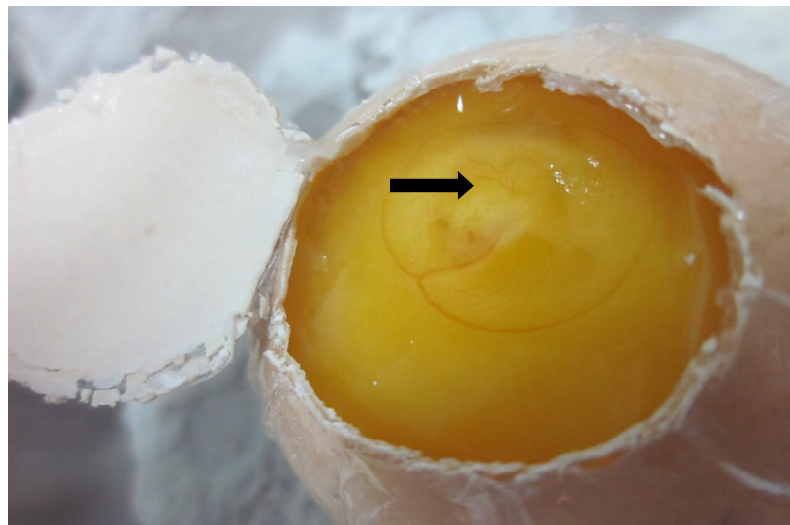


FIGURA 22 – FOTOGRAFIA DE UM EMBRIÃO DE 2 DIAS DE DESENVOLVIMENTO.

No detalhe da seta a vesícula vitelínica onde estão presentes as ilhotas sanguíneas, originadas a partir do processo de vasculogênese.

Os movimentos que possibilitam o dobramento do coração e a formação de novos vasos a partir dos vasos pré-existentes (angiogênese) ocorrem no tempo de 40 horas de incubação. Células internas à estas estruturas do sistema cardiovascular se transformam em hemocitoblastos, os quais, através de eventos de diferenciação celular dão origem as demais células que compõem o sangue (AREY, 1974; SWEENEY *et al.*, 1998).

Um dos componentes da vascularização extraembrionária são os vasos alantóicos, que surgem com 72 horas de incubação. A partir deste período, em aproximadamente 96 horas de desenvolvimento, o alantóide (divertículo da parede ventral do intestino posterior) aumenta sua dimensão devido à deposição dos produtos de excreção do embrião. Nesta fase, o alantóide intercala-se entre o âmnio e o cório. A junção do mesoderma somático presente nos dois anexos (âmnio e cório) com o mesoderma angiogênicos do alantóide caracteriza a formação da membrana corioalantóica (PATTEN, 1951).

A figura 23 ilustra a membrana corioalantóica presente em um embrião de galinha submetido a 6 dias de incubação. Essa estrutura extraembrionária se caracteriza por ser uma vesícula de forma achatada, altamente vascularizada e que se dispõe sobre o saco vitelínico e o embrião (PATTEN, 1951).

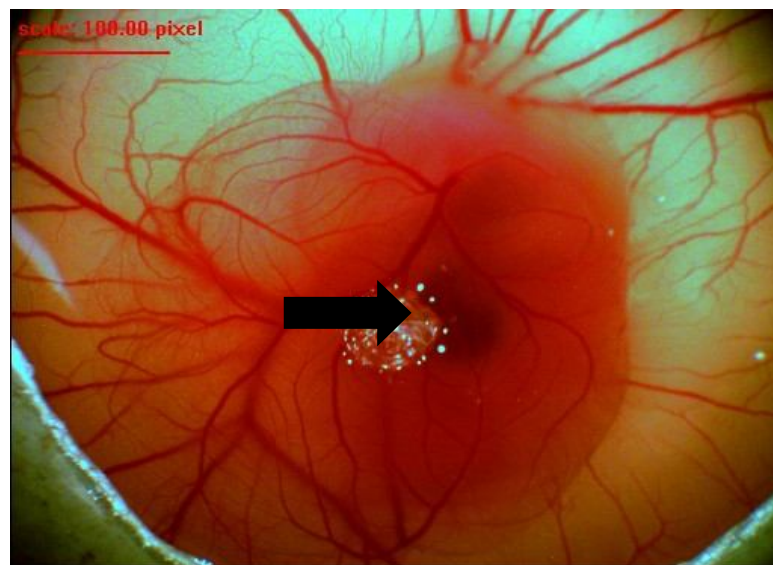


FIGURA 23 – FOTOGRAFIA DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE UM EMBRIÃO DE 6 DIAS DE DESENVOLVIMENTO.

No detalhe da seta a presença da membrana corioalantóica, onde a vascularização se originou a partir de vasos pré-existentes (angiogênese).

7.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS

Nos últimos anos têm se intensificado os estudos com polissacarídeos sulfatados obtidos de diferentes espécies de organismos marinhos. Neste contexto, os polissacarídeos sulfatados produzidos por algas marinhas apresentaram potente capacidade antitumoral (ROPELATTO, 2011; CARVALHO, 2013). Em estudos de cultivo celular (*in vitro*) realizados com diferentes linhagens tumorais, os polissacarídeos sulfatados inibiram a proliferação destas células neoplásicas. Estes polímeros também possuem atividade em camundongos (*in vivo*) inibindo a evolução de tumores sólidos (ATHUKORALA *et al.*, 2009).

Como discutido no item 7.1.4 deste Capítulo, é comprovado que alguns polissacarídeos sulfatados são capazes de modular a diferenciação, a proliferação e a migração de células endoteliais vasculares, através do bloqueio da ligação do fator de crescimento (VEGF) aos seus receptores de membrana celular (IMAMURA e MITSUI, 1987; KOYONAGI *et al.*, 2003). Ademais, estes polímeros são capazes de estimular o sistema imune no organismo, bem como induzir à apoptose de células cancerígenas (AISA *et al.*, 2005).

Um polissacarídeo sulfatado obtido da alga parda *Ecklonia cava*, composta majoritariamente por fucose e por menores concentrações de galactose e de massa molar estimada em 1381 kDa, apresentou atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais de leucemia U-937 e HL-60 (ATHUKORALA *et al.*, 2009). Fucanas obtidas de outra espécie de alga parda, *Fucus vesiculosus*, também apresentaram atividade antiproliferativa sobre células de linfoma humano HS-Sultan (AISA *et al.*, 2005). Foi verificado que essas fucanas obtidas de espécies diferentes de algas pardas possuem o mesmo mecanismo de ação em relação ao bloqueio da proliferação celular, que é através da indução das células tumorais a apoptose (AISA *et al.*, 2005; ATHUKORALA *et al.*, 2009).

Costa e colaboradores (2010) estudaram a atividade antiproliferativa de 11 espécies de algas marinhas pertencentes às divisões Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta, em de células de câncer cervical (HeLa). Todos os polissacarídeos testados demonstraram atividade antiproliferativa de maneira dose-dependente, no entanto, alguns polissacarídeos foram mais ativos sobre as células cancerígenas.

Essa distinção de atividade entre os polissacarídeos obtidos das diferentes espécies de algas parece estar vinculada às diferenças estruturais destes polissacarídeos.

A atividade antitumoral de fucanas sulfatadas purificadas obtidas de algas pardas foi avaliada em células tumorais de Sarcoma-180, de melanoma B16 e de carcinoma de pulmão Lewis. Uma observação importante neste estudo demonstrou que a habilidade antitumoral apresentada por estes polissacarídeos é devido à sua capacidade de inibir a angiogênese. O polímero inibiu o desenvolvimento das células tumorais através do bloqueio de VEGF aos seus receptores VEGFRs presentes na membrana celular. Foi verificado também que quando os polímeros nativos, que já possuíam algum grau de sulfatação, foram totalmente sulfatados através de modificações químicas, ocorreu uma potencialização na atividade antiangiogênica destes polissacarídeos (KOYANAGI *et al.*, 2003).

Apesar da maioria dos estudos com polissacarídeos antitumorais serem realizadas pelos ensaios *in vivo*, através de uma aplicação no local do câncer e *in vitro* utilizando o cultivo de células, Noda e colaboradores (1990) verificaram que a administração oral de algas em pó em camundongos afetados por carcinoma Ehrlich e Meth-A fibrosarcoma, também demonstrou um efeito antitumoral. As algas mais efetivas contra os dois tipos de câncer foram as espécies *Sargassum ringgoldianum* e *Porphyra yezoensis*.

Frações polissacarídicas obtidas de uma espécie de alga verde *Capsosiphon fulvescens* apresentaram atividade antitumoral sobre o sarcoma-180 e adicionalmente exibiram atividade imunoestimulante *in vitro* (PARK *et al.*, 2006).

No grupo de pesquisa GLICAM do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pesquisas em relação a atividade antitumoral utilizando as heteroramnanas sulfatadas obtidas da macroalga verde *Gayralia oxysperma* são realizadas. Estes estudos foram conduzidos por Ropelatto (2011) e Carvalho (2013) que revelaram que estes polissacarídeos são potentes agentes antitumorais em linhagens de glioma humano U87MG e U373MG. Carvalho (2013) verificou que atividade antitumoral dessas heteroramnanas se dá pela parada do ciclo celular.

Os estudos de atividade antitumoral de polímeros obtidos de algas se concentram principalmente, nos trabalhos realizados com polissacarídeos obtidos de algas pardas e de algas marrons, utilizando diferentes linhagens de células tumorais. No entanto, até o momento não foram encontrados relatos de pesquisas envolvendo polissacarídeos obtidos de macroalgas verdes marinhas e linhagens celulares de

glioma humano, exceto os trabalhos realizados por Ropelatto (2011) e Carvalho (2013).

7.2.1. Gliomas (astrocitomas)

São denominados de gliomas os tumores cerebrais originados a partir da mutação das células da glia. Além de constituírem aproximadamente 50% da massa do cérebro, essas células são responsáveis pela sustentação e nutrição dos neurônios. Este tecido é composto por três principais tipos de células os oligodendrócitos, os astrócitos e as células de Schann (ABTA, 2010).

Uma das principais características dos gliomas malignos é habilidade de invasão. Devido a este fator, um alto índice de recorrência é observado em pacientes após a cirurgia de remoção do tumor. Os gliomas são os tumores mais comuns dentre os tumores encontrados dentro da cavidade craniana, e apesar do grande avanço da medicina em relação aos diagnósticos e aos diferentes tratamentos desta doença, a média de sobrevivência de pacientes afetados pelo grau mais agressivo, não ultrapassa o período de 15 meses (DEMUTH; BERENS, 2004).

A denominação glioma pode ser subdividida, dependendo do tipo celular que deu origem ao tumor. Os gliomas podem ser classificados como oligodendrogliomas, astrocitomas e ependimomas, originados dos oligodendrócitos, astrócitos e células ependimais, respectivamente. Tumores originados de dois tipos ou mais de células da glia são chamados de gliomas mistos (ABTA, 2010).

As células da linhagem U87MG de astrocitoma, originadas a partir dos astrócitos, foram utilizadas neste trabalho e estão representadas na Figura 24. Em condições normais, os astrócitos possuem um corpo central de onde se projetam vários prolongamentos deixando a célula com um formato de estrela. Através de contato com axônios, sinapses e outros tipos celulares da glia, as extremidades destes prolongamentos celulares desempenham a função de manutenção das concentrações iônicas e de metabólitos em taxas adequadas com os neurônios, ademais, constituem uma barreira hemato-encefálica com o endotélio dos capilares, bem como rigoroso controle da difusão plasma-interstício neuronal (LEVITAN; KACZMAREK, 2002).

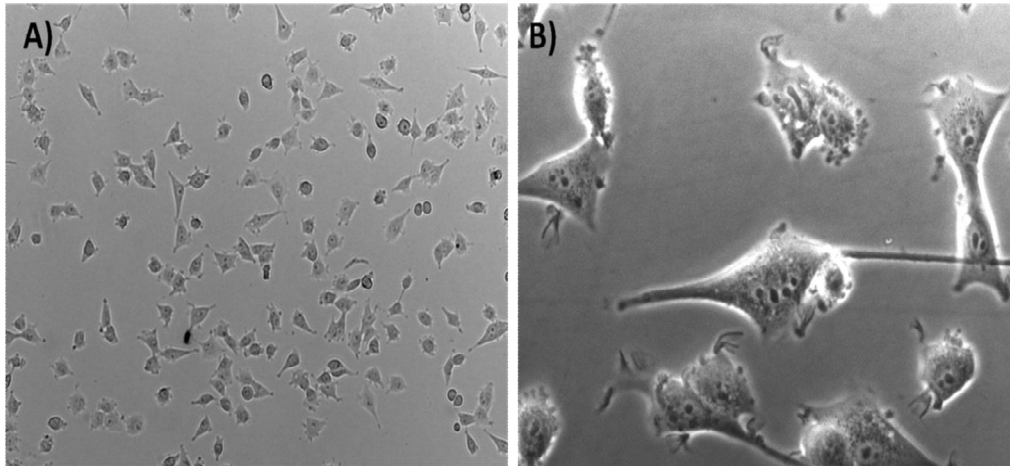


FIGURA 24 – FOTO DA LINHAGEM U87MG DE GLIOBASTOMA HUMANO. (A) Aumento de 100 x e (B) Aumento de 400 x.

FONTE: CARVALHO (2013).

Estudos histológicos permitiram classificar os astrocitomas em graus de I a IV, sendo esta classificação realizada a partir do nível de anormalidade celular. Os tumores de baixos graus (I e II) são ditos como benignos, e os tumores de altos graus (III e IV) referidos como malignos. Os tumores ditos como malignos possuem um maior potencial de agressividade, onde ocorre um rápido desenvolvimento do tumor devido à alta taxa de divisão celular. Devido ao caráter invasivo e agressivo dos tumores de graus III e IV, o único tratamento efetivo aplicado para estes tipos de tumores é a neurocirurgia (ABTA, 2010).

Indivíduos de 40 a 50 anos, principalmente homens, são os mais atingidos pelos glioblastomas multiformes (grau IV) que constituem aproximadamente 50% dos casos de gliomas. Os astrocitomas anaplásicos (grau III) são diagnosticados principalmente em adultos jovens. Anormalidades identificadas nos cromossomos 10 e 17 dessas linhagens podem estar ligadas ao desenvolvimento destes gliomas, no entanto, a causa específica dos tumores cerebrais, em geral, permanece desconhecida (ABTA, 2010).

Os sintomas característicos de um indivíduo com glioma são principalmente, o aumento da pressão intracraniana e a deficiência motora. Após a realização da remoção do tumor por neurocirurgia, o paciente é submetido à radioterapia, ou no caso do diagnóstico precoce do tumor, o tratamento por quimioterapia também pode ser realizado. Apesar de vários estudos serem realizados com diferentes tipos de medicamentos no tratamento de astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme, não se obteve sucesso, visto que todos demonstram efeitos colaterais adversos (ABTA, 2010).

7.3. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS

O sistema de coagulação sanguínea consiste de duas vias, uma via denominada intrínseca e outra denominada extrínseca, onde uma série de fatores estão envolvidos regulando este mecanismo. A coagulação sanguínea procede através destes fatores de coagulação, sempre que ocorra uma lesão vascular com sangramento, formando-se assim, o coágulo, onde dentro de poucos minutos no local da lesão, o sangramento é cessado. Como anticoagulantes endógenos e exógenos interferem nos fatores de coagulação por inativação ou restrição, a coagulação sanguínea pode ser prolongada ou interrompida (JUNG; LE; KIM, 2001). Estes compostos anticoagulantes são utilizados com finalidades terapêuticas, como por exemplo, para curar a hemofilia (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

A heparina é o polissacarídeo sulfatado utilizado por mais de 50 anos como um anticoagulante comercial e é amplamente empregado na prevenção de distúrbios tromboembólicos venosos. No entanto, vários efeitos secundários da heparina têm sido observados, tais como o desenvolvimento de trombocitopenia, o efeito hemorrágico, a ineficácia em deficiências de antitrombina adquirida ou congênita e a incapacidade para inibir a trombina ligada à fibrina (PEREIRA; MELO; MOURÃO, 2002). Além disso, a heparina está disponível em concentrações muito baixas no intestino de porco ou pulmão bovino, de onde é principalmente extraída. Portanto, a necessidade de descobrir fontes alternativas de substâncias anticoagulantes é necessária, devido ao grande interesse, na possibilidade de uma

terapia anticoagulante com mais segurança (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

Vários polissacarídeos que apresentam atividade anticoagulante, especialmente os obtidos de algas marinhas vermelhas e marrons, têm sido isolados e caracterizados. Estes são representados por uma variedade estrutural de galactanas e fucanas sulfatadas, as quais podem apresentar elevada atividade anticoagulante, a depender da estrutura química e da massa molar do polímero. No entanto, destacam-se os polissacarídeos obtidos de algas verdes marinhas, que são menos investigados quanto às propriedades anticoagulantes, em relação aos polissacarídeos obtidos de algas marrons e vermelhas (MAO *et al.*, 2009; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

Polissacarídeos de algas verdes marinhas apresentam atividade anticoagulante (TABELA 12). Em especial, os polímeros obtidos de espécies de macroalgas do gênero *Monostroma* (LEE *et al.*, 1998; HAYAKAWA *et al.*, 2000; MAO *et al.*, 2009; e LI *et al.*, 2012). Maeda e colaboradores (1991) demonstraram que polissacarídeos sulfatados obtidos de *Monostroma nitidum* apresentaram atividade anticoagulante seis vezes superior a da heparina. Mais recentemente, Mao e colaboradores (2009) constataram que polissacarídeos sulfatados obtidos de *Monostroma latissimum* também apresentaram alta atividade anticoagulante quando comparados à heparina.

Os polissacarídeos citados acima foram testados quanto à atividade anticoagulante, por pelo menos um dos três ensaios clássicos de coagulação *in vitro*: prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), prolongamento do tempo de trombina (TT) e prolongamento do tempo de protrombina (PT). O prolongamento do TTPA sugere a inibição dos fatores intrínsecos e é a medida do tempo de coagulação dependente da via intrínseca. O TT é a inibição da atividade de trombina, ou da polimerização da fibrina, como tempo de coagulação dependente da inibição da trombina. E PT é ensaio que avalia o tempo de coagulação da via extrínseca (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

A relação entre a estrutura de alguns polissacarídeos sulfatados e a atividade anticoagulante é discutida por Collic e colaboradores (1991). Os grupos sulfato presentes em polissacarídeos podem aumentar as ligações específicas e não específicas para uma variedade de proteínas biologicamente ativas, que estão envolvidas nas vias de coagulação. A atividade anticoagulante de galactanas

sulfatadas, por exemplo, depende principalmente da natureza das unidades monossacarídicas, da posição e do teor dos grupos sulfato (SILVA *et al.*, 2010).

No geral, para ramnanas sulfatadas é descrito que, principalmente os fatores de composição monossacarídica, de teor e posição de grupos sulfato e massa molar estejam envolvidos com a atividade anticoagulante destes polímeros (LI *et al.*, 2012). Athukorala e colaboradores (2009) estudaram a relação entre a massa molar e a atividade anticoagulante de algas marinhas e como resultados, concluíram que polissacarídeos sulfatados de alta massa molar (acima de 30 kDa), obtidos de *C. fragile*, exibiram maior capacidade anticoagulante, quando comparados aos seus fragmentos polissacarídicos obtidos por hidrólise enzimática (abaixo de 5 kDa). No entanto, para discutir melhor esta relação de atividade anticoagulante e de estrutura química dos polímeros obtidos de espécies de macroalgas verdes marinhas, estudos futuros precisam ser realizados (LI *et al.*, 2012).

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, TEOR E POSIÇÃO DOS GRUPOS SULFATO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES MARINHAS (Chlorophyta).

| Principais monossacarídeos ^a | Espécie | Porcentagem e posição dos grupos sulfato ^b | Atividade anticoagulante (TTPA, TT e TP) ^c | Referencia |
|---|-------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| Ara (80,5%), Ram (10,7%), Gal (4,8%) e GlcA (4,0%) | <i>Enteromorpha Clathrata</i> | 31,0% (C3 nas unidades de arabinose 1,4-ligada) | TTPA (50 µg.mL ⁻¹ , > 200 s) TT (50 µg.mL ⁻¹ , > 120 s) TP (não apresentou atividade) | QI <i>et al.</i> , (2012) |
| Ram (84,0%), Xil (4,8%), Glc (4,6%), gal (2,3%), man (1,9%) e GlcA (2,4%) | <i>Monostroma latissimum</i> | 26,1% (C3 nas unidades de ramnose 1,2-ligada e C2 nas unidades de ramnose 1,3-ligada) | TTPA (16 µg.mL ⁻¹ , > 200 s) TT (16 µg.mL ⁻¹ , > 120 s) TP (não apresentou atividade) | LI <i>et al.</i> , (2012) |
| Ram (86,7%), Glc (6,9%) e Xil (6,3%) | <i>Monostroma latissimum</i> | 23,5% (C3 e C4 nas unidades de ramnose 1,2-ligada) | TTPA (20 µg.mL ⁻¹ , > 200 s) TT (10 µg.mL ⁻¹ , > 120 s) TP (não apresentou atividade) | MAO <i>et al.</i> (2009) |
| n.d | <i>Monostroma nitidum</i> | n.d | TTPA (100 µg.mL ⁻¹ , > 200 s) | ATHUKORALA <i>et al.</i> , (2009) |
| n.d | <i>Codium fragile</i> | n.d | TTPA (100 µg.mL ⁻¹ , > 200 s) | ATHUKORALA <i>et al.</i> , (2009) |
| n.d | <i>Ulva perfusa</i> | n.d | TTPA (100 µg.mL ⁻¹ , = 55 s) | ATHUKORALA <i>et al.</i> , (2009) |

n.d = não determinado; ^a Ram = ramnose, Glc = glucose, Xil = xilose, Gal = galactose, Ara = arabinose, Man = manose, GlcA = ácido glucourônico e GalA = ácido galactourônico; ^b Determinado como SO₃Na; ^c TTPA = Tempo de tromboplastina parcial ativada, TT = Tempo de trombina e TP = Tempo de protrombina.

7.4. ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS

A atividade antiviral de polissacarídeos obtidos de algas marinhas foi inicialmente identificada por Gerber e colaboradores (1958), que constataram que polissacarídeos obtidos da espécie *Gelidium cartilagenium* (Rhodophyceae) protegiam embriões de galinha contra o vírus Influenza B e o vírus da caxumba. Os polissacarídeos com atividade antiviral, na sua maioria são altamente sulfatados (HUHEIHEL *et al.*, 2002; CASSOLATO *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2012). Diversas espécies de algas marinhas produzem quantidades significantes de polissacarídeos sulfatados com estruturas particulares e complexas capazes de inibir a replicação de vírus envelopados, incluindo membros de flavivírus, arenavírus, togavírus, ortopoxvírus, rabdovírus e herpesvírus (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997).

A estrutura química, incluindo o grau de sulfatação, a massa molar, os açúcares constituintes, a conformação e a estereoquímica determinam a atividade antiviral de polissacarídeos obtidos das algas marinhas (ADHIKARI *et al.*, 2006; DAMONTE; MATULEWICZ; CEREZO, 2004). Além disso, o grau de sulfatação e o posicionamento dos grupamentos sulfato desempenham um papel importante na atividade antiviral destes polímeros. Polissacarídeos de algas com baixo grau de sulfatação, geralmente são inativos contra os diferentes tipos de vírus envelopados (DAMONTE; MATULEWICZ; CEREZO, 2004).

7.4.1. Polissacarídeos sulfatados de algas verdes com atividade contra os vírus Herpes Simplex (HSV)

O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é capaz de infectar uma ampla variedade de células humanas e pode causar várias doenças em indivíduos imunodeprimidos (SANTOS *et al.*, 1999). A infecção viral ocorre através da ligação do vírus à membrana da superfície celular, chamada de etapa de adsorção viral, a qual é realizada pela interação entre regiões carregadas positivamente presentes nas glicoproteínas virais, denominadas gB e gC, com o sulfato de heparana da superfície da célula alvo (WUDUM; SPEAR, 1989; HEROLD *et al.*, 1995). Após a adsorção do

vírus à célula, a glicoproteína do envelope viral (gD) se liga aos receptores HVEM (*herpes virus entry mediators*) expondo um sítio de ligação para o heterodímero gH/gL. Após a ligação do heterodímero, ocorre a exposição do sítio de fusão no heterodímero e na gB, o que permite a penetração do vírus na célula por fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, conduzindo a entrada do DNA viral.

Feyzi e colaboradores (1997) constataram que a sequência mínima necessária para a interação da heparina com a glicoproteína gC do envelope viral é [1→4)-β-L-(¹C₄)-IdoA2-OSO₃-(1→4)-α-D-(⁴C₁)-GlcNR'-OSO₃-(1→], com no mínimo 10-12 unidades repetitivas. E o efeito inibitório dos polissacarídeos sulfatados sobre o HSV deve-se principalmente à inibição da etapa de adsorção do vírus à célula hospedeira. Desta forma, estruturas análogas à heparina podem ser responsáveis pelas atividades antivirais apresentadas por polímeros obtidos de algas marinhas (DUARTE *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado que polissacarídeos sulfatados obtidos de algas verdes marinhas são potentes como antiherpéticos frente ao HSV-1 e ao HSV-2 (TABELA 13). Estudos de Lee e colaboradores (2010) demonstraram que ramnanas sulfatadas obtidas de *Monostroma nitidum* foram potentes inibidoras do HSV-2 (IC₅₀=0,87 µg.mL⁻¹), e concluem que essa capacidade de inibição viral ocorre durante a etapa de adsorção do vírus à superfície celular.

Nos estudos de Cassolato e colaboradores (2008), heteroramnanas sulfatadas obtidas de *G. oxysperma* exibiram potente atividade antiherpética *in vitro*, com valores de IC₅₀ na faixa de 0,27 a 0,3 µg.mL⁻¹ para o HSV-1 e valores dez vezes menores (entre 0,036 e 0,054 µg.mL⁻¹) para o HSV-2, demonstrando que as heteroramnanas estudadas são capazes de inibir a multiplicação desses dois vírus.

A utilização de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas apresenta inúmeras vantagens sobre outras classes de antivirais, principalmente por apresentarem baixo custo de produção, um amplo aspecto de atuação e baixa toxicidade em células animais. Essas características fazem com que esses polímeros sejam candidatos promissores no tratamento de infecções virais. Ressalta-se que muitos estudos de triagem clínica ainda devem ser realizados com esses compostos (FERREIRA, 2011; WIJESKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, TEOR DE GRUPOS SULFATO E ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA (HSV-1 E HSV-2) DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES MARINHAS (Chlorophyta).

| Principais monossacarídeos ^a | Espécie | Percentagem e posição dos grupos sulfato ^b | Vírus ^c | Atividade antiviral CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹) ^d | Referencia |
|--|---------------------------|---|--------------------|--|----------------------------------|
| Ram, Glc, Xil e GlcA | <i>Monostroma nitidum</i> | 31,7% (C3 nas unidades de ramnose 1,2-ligada e C2 nas unidades de ramnose 1,3-ligada) | HSV-2 | 0,87 | LEE <i>et al.</i> , (2010) |
| Ram (67,0%), Glc (10%), Xil (10%), Gal (6%), Ara (5%), Man (2%) e 17% de GlcA e GalA | <i>Gayralia oxysperma</i> | 26,1% | HSV-1 HSV-2 | 0,30 0,05 | CASSOLATO <i>et al.</i> , (2008) |
| Gal e IdoA | <i>Codium fragile</i> | 11,0% | HSV-2 | 4,70 | OHTA <i>et al.</i> , (2009) |
| Gal, Glc, Ara e Xil | <i>Caulerpa racemosa</i> | 9,0% | HSV-1 HSV-2 | 2,20 - 4,20 3,0 | GHOSH <i>et al.</i> , (2004) |

^a Ram = ramnose, Glc = glucose, Xil = xilose, Gal = galactose, Ara = arabinose, Man = manose, GlcA = ácido glucourônico, GalA = ácido galactourônico e IdoA = ácido idurônico; ^b Determinado como SO₃Na; ^c HSV-1 = vírus Herpes Simplex tipo 1, HSV-2 = vírus Herpes Simplex tipo 2; ^d CI₅₀ = Concentração inibitória 50%.

8. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia empregada para os estudos de modulação da vascularização em embriões de galinha está esquematizada na Figura 25.

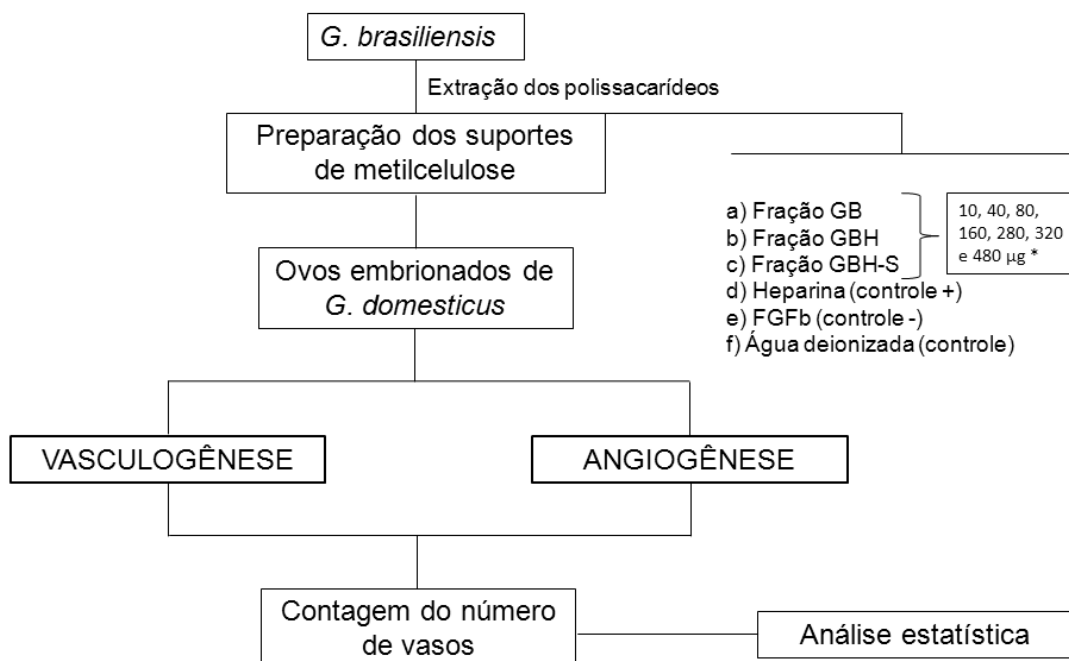


FIGURA 25 – ESQUEMA GERAL DA METODOLOGIA UTILIZADA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES GB, GBH E GBH-S EM RELAÇÃO A MODULAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO EM EMBRIÕES DE GALINHA.

a) fração GB: fração bruta; b) fração GBH: fração purificada c) fração GBH-S: produtos de degradação controlada de Smith; d) controle positivo: antivascularizante e antiangiogênico (heparina); e) controle negativo: indutor da vascularização e da angiogênese (FGFb); f) controle: os suportes de metilcelulose foram preparados apenas com água deionizada. * Com modificações na avaliação do processo de angiogênese.

8.1. MODULAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO EM EMBRIÕES DE GALINHA

8.1.1. Modelo Biológico – Embriões de *G. domesticus*

Ovos de galinha fertilizados e livres de patógenos específicos foram gentilmente fornecidos pela Professora Claudia Feijó Ortolani-Machado do Departamento de Biologia Celular (UFPR-Curitiba) para os estudos de vasculogênese e angiogênese deste trabalho. No laboratório este material foi armazenado na temperatura de aproximadamente 16 °C por até no máximo 48 horas até o início do período de incubação. Os estudos descritos a seguir utilizando embriões de *G. domesticus* foram realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEA-UFPR) (Processo: 23075.098873/2011-37).

8.1.2. Ensaio da vasculogênese na membrana vesícula vitelínica

Para avaliar a capacidade de modulação da vascularização das frações GB, GBH e GBH-S foi inicialmente realizado o ensaio da vasculogênese na membrana da vesícula vitelínica (MV) do embrião de galinha. Este método foi adaptado do ensaio da membrana corioalantóica (CAM-Assay) (JAKOB *et al.*, 1978) com algumas modificações (DIAS *et al.*, 2008).

Concentrações de 10, 40, 80, 160, 320 e 480 µg das frações GB, GBH e GBH-S foram utilizadas para os ensaios da MV. Heparina porcina (Sigma-Aldrich) na concentração 80 µg foi utilizada como controle positivo (antivascuogênica). O fator de crescimento FGFb (Sigma-Aldrich) na concentração de 50 ng.mL⁻¹ foi empregado como controle negativo (indutor da vasculogênese).

Ovos embrionados de galinha foram incubados em chocadeira (Lab300-GERA) com umidade aproximada de 65% e temperatura de 37,5 °C por um período de 48 horas (dias embrionário E2, estágio 12-HH; HAMBURGER; HAMILTON, 1951) (FIGURA 26D). Após este período, os ovos foram removidos da incubadora e em

fluxo laminar unidirecional (CFLV09-VECO) foi aberto um orifício na casca (10 mm de diâmetro), em sua base maior, onde está localizada a câmara de ar (FIGURA 26C). Esta abertura é necessária para separar a membrana interna da casca e a membrana vitelínica, permitindo que o suporte seja implantado na MV. Os embriões não viáveis foram descartados. Após, os tratamentos (n = 8) foram realizados por meio de suportes de metilcelulose em forma de disco (2 mm de diâmetro, 1 suporte/embrião) e implantados sobre ilhotas sanguíneas da membrana vascular da vesícula vitelínica, próximas ao embrião (FIGURA 26D).

A confecção dos suportes de metilcelulose foi realizada conforme metodologia descrita por Dias e colaboradores (2008). Uma solução de metilcelulose (0,45%) foi preparada em água deionizada estéril onde as diferentes concentrações das frações polissacarídicas GB, GBH e GBH-S (10, 40, 80, 160, 280, 320 e 480 μ g) e o controle positivo heparina (80 μ g) e negativo FGFb (50 ng.mL⁻¹) foram adsorvidos nesta solução de metilcelulose e polimerizados em câmara de fluxo laminar (10 μ L/suporte) sobre superfície de Teflon[®]. Da mesma forma, também foram confeccionados discos sem tratamento, os quais continham apenas água deionizada estéril e metilcelulose (0,45%), sendo estes utilizados como parâmetro de vascularização normal do embrião (controle).

Após a aplicação dos tratamentos, as aberturas nas cascas foram fechadas com a própria casca em forma de tampa, seladas com fita crepe, e os ovos retornados à incubadora para continuarem o desenvolvimento por mais 48 horas (dia embrionário E4, estágio 24-HH; HAMBURGER e HAMILTON, 1951). Posteriormente, os ovos foram retirados da incubadora e a abertura na casca foi reaberta para avaliação da vasculogênese na MV (FIGURA 26E).

A determinação da modulação da vascularização na MV foi realizada através da contagem de vasos sanguíneos que interceptaram o disco de metilcelulose. Para facilitar este método de contagem, discos de papel filtro (2 mm de diâmetro) foram sobrepostos aos discos de metilcelulose (FIGURA 26E). Após, a contagem de vasos foi realizada através de microscópio estereoscópico (BEL[®]) no aumento de 20 vezes (FIGURA 26F) e a resposta dos tratamentos e dos controles positivo e negativo foi comparada ao número de vasos da vascularização normal do embrião (discos de água deionizada esterilizada e metilcelulose 0,45%). Para facilitar a visualização dos resultados a MV foram captados através de câmera fotográfica acoplada ao microscópio estereoscópico.

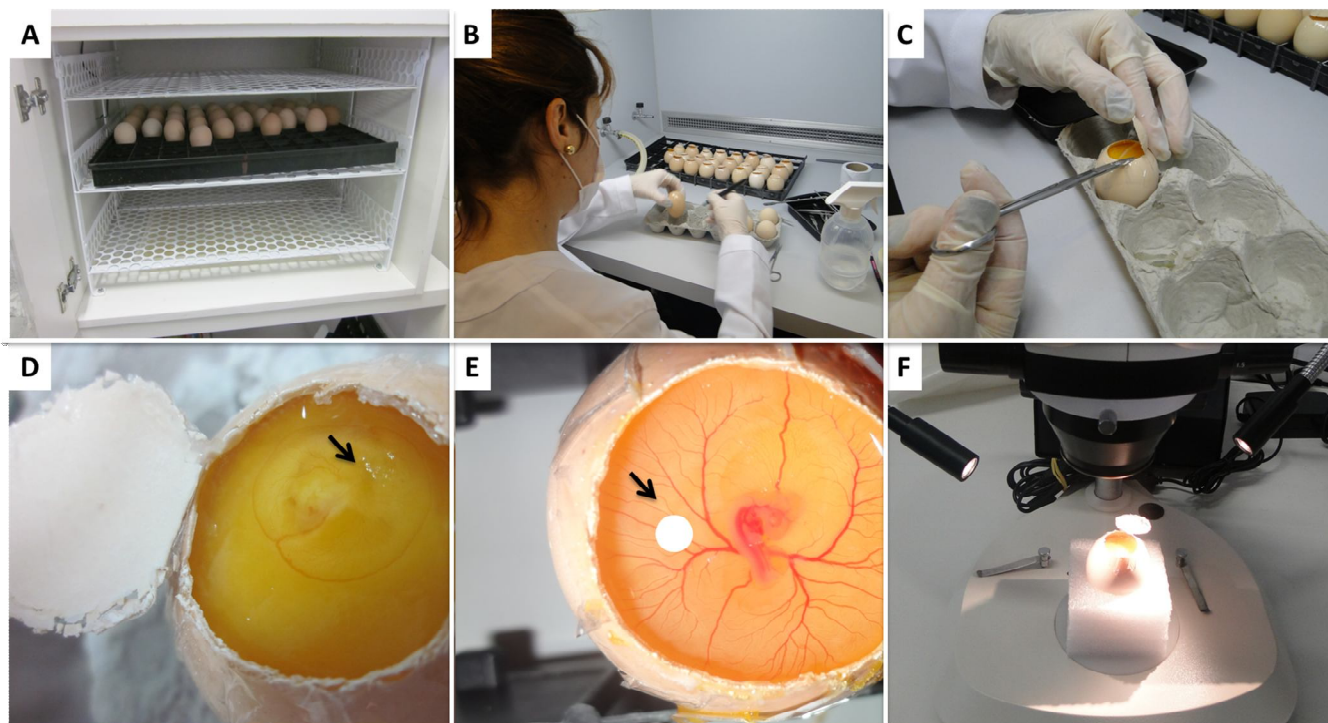


FIGURA 26 - ESQUEMA DE FOTOGRAFIAS DEMONSTRANDO A METODOLOGIA DE ENSAIO DA VASCULOGÊNESE EM MEMBRANA DA VESÍCULA VITELÍNICA DE EMBRIÕES DE *G. domesticus*.

(A) Incubadora (chocadeira); (B) Manipulação dos ovos em câmara de fluxo laminar; (C) Abertura do orifício na casca do ovo; (D) Embrião de 48 horas de desenvolvimento. A seta indica o local onde estão presentes as ilhotas sanguíneas, onde foram aplicados os tratamentos; (E) Embrião de 96 horas de desenvolvimento. Nesta etapa, após a reabertura dos ovos, os discos de papel filtro foram sobrepostos aos discos de metilcelulose e a contagem de vasos sanguíneos foi realizada na zona circunvizinha ao disco de papel filtro (F) com o auxílio de microscópio estereoscópico.

8.1.3. Ensaio da angiogênese na membrana corioalantóica

Para avaliação do processo de angiogênese foi realizado o ensaio na membrana corioalantóica (CAM-assay), de acordo com os procedimentos previamente descritos por Jakob e colaboradores (1978). Neste ensaio, foram utilizadas as frações GB (fração bruta) e GBH-S (fração purificada submetida à degradação controlada de Smith), visto que para o ensaio de vasculogênese, a fração purificada GBH foi a menos efetiva.

Os procedimentos de incubação dos ovos, confecção dos discos de metilcelulose, abertura dos ovos e contagem dos vasos sanguíneos foram realizados conforme a metodologia de vasculogênese. A fim de facilitar a separação das membranas da cas e corioalantóica, no quarto dia de incubação os ovos foram retirados da incubadora e em fluxo laminar foi feito um orifício na casca dos ovos (2 mm) na extremidade oposta do embrião e 3 mL de albumina foram retiradas com auxílio de seringa com agulha estéril (FIGURA 27A). Estas pequenas aberturas foram seladas com fita crepe e os ovos reincubados por mais dois dias.

No sexto dia de incubação (dia embrionário - E6; estágio 29-HH), os ovos foram retirados da estufa e, em câmara de fluxo laminar, foi realizada a aplicação dos tratamentos com os suportes de metilcelulose, preparados nas concentrações de 40, 80, 160, 320 e 480 μg da fração GB e 40, 80, 160, 320 da fração GBH-S. Heparina (80 μg) foi utilizada como controle positivo e FGFb (50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) como controle negativo. Os embriões não viáveis foram descartados. Conforme os ensaios de vasculogênese, para o ensaio de angiogênese também foram confeccionados discos sem tratamento, os quais continham apenas água deionizada estéril e metilcelulose (0,45%), sendo estes utilizados como parâmetro de vascularização normal da membrana corioalantóica (controle). Os suportes foram implantados no terço externo da membrana corioalantóica, onde vasos capilares estavam crescendo (FIGURA 27B). Então, os ovos foram fechados e reincubados por mais 48 horas (E8; estágio 34-HH).

Concluído o período de 8 dias de incubação, os ovos foram retirados da incubadora e a região onde foram aplicados os tratamentos foi analisada em microscópio estereoscópico com aumento de 20X (FIGURA 27D). A resposta dos polissacarídeos sobre a angiogênese foi determinada pela contagem do número de

vasos sanguíneos, conforme metodologia de vasculogênese, com auxílio de disco de papel filtro (FIGURA 27C). As respostas dos tratamentos e dos controles (positivo e negativo) foram comparadas ao número de vasos da vascularização normal do embrião, o qual foi tratado somente com os discos contendo água deionizada esterilizada e metilcelulose 0,45%. Os resultados observados na MC foram captados através de câmera fotográfica acoplada ao microscópio estereoscópico.

8.1.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias ($n = 8$) \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através de análise de variância univariada (ANOVA), seguida do teste Tukey, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos. Para as análises estatísticas e para confecção dos gráficos foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5*.

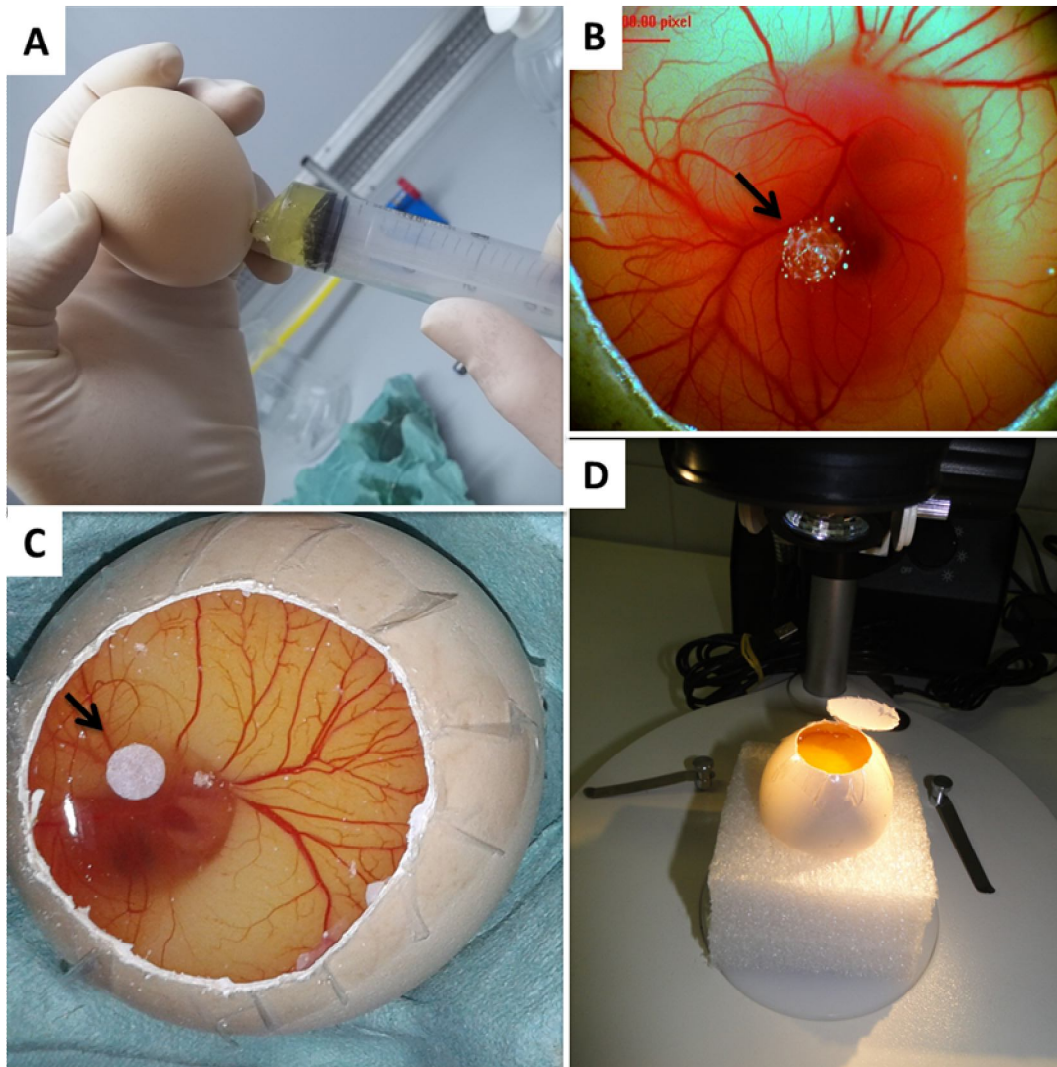


FIGURA 27 - ESQUEMA DE FOTOGRAFIAS DEMONSTRANDO A METODOLOGIA DE ENSAIO DA ANGIOGÊNESE EM MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÕES DE *G. domesticus*.

(A) Retirada de 3 mL de albumina do ovo com 4 dias de incubação; (B) Embrião de 6 dias de desenvolvimento. Etapa em que foram implantados os tratamentos no terço externo da membrana corioalantóica. No detalhe da seta o aspecto do disco de metilcelulose; (C) Embrião de 8 dias de desenvolvimento. Nesta etapa, após a reabertura dos ovos, os discos de papel filtro (seta) foram sobrepostos aos discos de metilcelulose e a contagem de vasos sanguíneos foi realizada na zona circunvizinha ao disco de papel filtro (D) com o auxílio de microscópio estereoscópico.

8.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro*

A atividade antitumoral *in vitro* das frações GB e GBH-S foram realizadas em colaboração com o grupo de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

8.2.1. Linhagem celular utilizada

Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados em células tumorais de glioma humano da linhagem U87MG (glioblastoma grau IV). A linhagem celular foi cedida pela Prof^ª. Dr^ª. Mari Cleide Soyogar (Laboratório de Biologia Celular e Molecular; Núcleo de Terapia Celular – NUCEL) da Universidade de São Paulo (USP). O cultivo das células de glioma foi realizado em DMEM alta glucose contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) e gentamicina em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

8.2.2. Preparação das frações polissacarídicas para o ensaio biológico

Para realizar o ensaio biológico de atividade antitumoral dos polissacarídeos de *G. brasiliensis* foi preparada uma solução estoque de 5 mg.mL⁻¹ das frações GB e GBH-S em água miliQ. Para esterilização destas amostras, as soluções polissacarídicas foram filtradas em filtro estéril, com limite de exclusão de 0,22 µm, em fluxo laminar. A dosagem de açúcares totais das frações GB e GBH-S foi realizada de acordo com Dubois *et al.* (1956) afim de ajustar corretamente as concentrações de polissacarídeos que foram utilizadas. Para o ensaio de viabilidade celular, as concentrações utilizadas foram de 25, 100 e 500 µg.mL⁻¹ em termos de açúcar total dissolvidos em meio de cultura.

8.2.3. Determinação da viabilidade celular das células de astrocitoma

O método *in vitro* do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio), que determina a viabilidade celular através de ensaio colorimétrico, foi utilizado para determinar a atividade antitumoral das heteroramnanas de *G. brasiliensis* conforme Mossmann (1983) com modificações.

As células tumorais da linhagem U87MG foram contadas e plaqueadas 1×10^4 células/poço em placa de 96 poços com volume final de 300 μL em cada poço. Após, foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO_2 por 24 horas, para a adesão das células nas placas. O meio de cultura foi removido e adicionado os diferentes polissacarídeos nas concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo incubados por 24 e 48 horas em estufa a 37 °C, 5% CO_2 . Após incubação, o meio de cultura foi removido e adicionado 300 μL da solução de MTT em HBSS (5 mg.mL^{-1}) e incubado por 2 horas em estufa nas mesmas condições anteriores. Após esse período o MTT que não reagiu foi retirado e adicionado 300 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os sais de formazana formados. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (TECAN INFINITE M200) com filtro de 570 nm, utilizando como branco o DMSO. A condição controle, representada como 100% de viabilidade celular foi correspondente a células mantidas somente com meio de cultura. Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados em quatro experimentos independentes e em triplicata para cada concentração.

8.2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software *GraphPad Prism* 5 sendo os resultados submetidos à análise de variância univariada (ANOVA), seguida do teste Tukey, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

8.3. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Os ensaios de atividade anticoagulante foram realizados em coagulômetro CORNLEY KL340 conforme os métodos descritos por Mourão *et al.* (1996). Kits comerciais HemosIL™ da INSTRUMENTATION LABORATORY e plasma normal humano citratado foram utilizados para os três ensaios clássicos de coagulação: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), Tempo de Trombina (TT) e Tempo de Protrombina (TP).

Concentrações de 0,1; 1,0; 5,0; 10; 20; 40; 60; 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações polissacarídicas GB e GBH e concentrações de 0,1; 1,0; 5,0; 10; 20; 40 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração GBH-S foram utilizadas para os ensaios de coagulação. Heparina porcina (Sigma-Aldrich) nas concentrações 0,1-20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi empregada como controle positivo.

8.3.1. Ensaio de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

O ensaio de TTPA foi realizado com amostras de plasma humano normal citratado (90 μL) na presença de 10 μL dos polissacarídeos nas concentrações descritas no item anterior, solubilizados em NaCl 0,9%, seguido de incubação à 37 °C por 60 segundos. Após, foram adicionados 100 μL do reagente comercial para ensaio de TTPA pré-aquecido, sendo realizada nova incubação a 37 °C por mais 2 minutos. Cloreto de cálcio pré-aquecido (100 μL , 0,25 mol/L) foi adicionado e o TTPA medido pelo tempo de formação do coágulo em coagulômetro.

8.3.2. Ensaio de tempo de trombina (TT)

Para realizar o ensaio de TT, plasma humano normal citratado (90 μL) foi misturado com 10 μL de diferentes concentrações dos polissacarídeos solubilizados em NaCl 0,9% e incubados por 60 segundos à 37 °C. Então, 200 μL pré-aquecidos

de reagente comercial para ensaio de TT foram adicionados, e o tempo de formação do coágulo foi medido em coagulômetro.

8.3.3. Ensaio de tempo de trombina (TP)

O ensaio de TP foi realizado com plasma humano normal citratado (90 µL) misturado com 10 µL de diferentes concentrações dos polissacarídeos solubilizados em NaCl 0,9%, incubados por 60 segundos à 37 °C. Em seguida, 200 µL pré-aquecidos de reagente comercial para ensaio de TP foram adicionados e o tempo de coagulação é medido em coagulômetro.

8.3.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ($n = 3$) \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através do software *GraphPad Prism 5*.

8.4. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIVIRAL

Os ensaios de atividade antiviral foram conduzidos com a fração bruta GB, sendo realizados no Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Villela Romanos, com a qual o grupo GLICAM do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR mantém colaboração científica.

8.4.1. Células e Vírus

Para os ensaios antivirais foram utilizadas as células Vero, linhagem isolada de rim de macaco verde africano. Para o cultivo destas células foi utilizado o meio essencial mínimo (MEM) de Eagle suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina, 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fungizona e 10% de soro fetal bovino inativado por calor e mantido a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂.

O HSV-1 foi isolado de lesões nos lábios e o HSV-2 isolado de lesões na genitália de humanos no Departamento de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. A identificação dos vírus foi empregada a reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) utilizando *primers* específicos (MARKOULATOS *et al.*, 2001).

8.4.2. Ensaio citotóxico

Para a determinação das concentrações máximas não tóxicas (CMNT), as monocamadas de células Vero foram expostas às concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,15 mg.mL^{-1} da fração GB e incubadas a 37 °C sob atmosfera com 5% de CO₂ por 48 horas. Após este período, foram observadas as alterações morfológicas das células tratadas com os polissacarídeos em microscópio óptico invertido (Leitz) e a CMNT foi determinada (WALKER *et al.*, 1971).

A viabilidade celular foi avaliada através da captação do vermelho neutro pelas células conforme o método de Borefreund e Puerner (1985) com modificações. As células foram incubadas com solução de vermelho neutro a 0,01% por 3 horas a 37 °C sob atmosfera com 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi removido e as células foram fixadas com formalina 4%, em tampão fosfato de sódio pH 7,2. O corante incorporado pelas células viáveis foi eluído por uma mistura de solventes contendo metanol, ácido acético e água na proporção de 50:1:49. A captação da coloração pelas células foi avaliada por densidade óptica (DO) do eluído a 490 nm em espectrofotômetro automático (ELx800TM-Bio-TeK Instruments). A CC₅₀

(concentração citotóxica para 50% das células em cultura) foi definida como a concentração necessária para reduzir em 50% a captação do corante.

8.4.3. Ensaio de atividade antiviral

A metodologia utilizada para a determinação da atividade antiviral da fração GB foi através do método de redução do título viral. Os títulos virais foram calculados utilizando o método estatístico de Reed e Muech (1938) e foram expressos como a dose infecciosa para 50% da cultura do tecido (DICT₅₀ – dose infecciosa para 50% da cultura de tecido) por mL.

Inicialmente foi feita uma triagem dos polissacarídeos sulfatados quanto à atividade antiviral. Nesta etapa inicial, as monocamadas de células Vero foram tratadas com a fração polissacarídica GB na CMNT e uma suspensão viral (100 DICT₅₀.mL⁻¹) foi adicionada as culturas de células tratadas e não tratadas (controle do vírus) com a fração GB. Após 48 horas de incubação a 37 °C (em atmosfera com 5% de CO₂) o sobrenadante foi coletado e os títulos virais foram determinados em células tratadas e não tratadas.

8.4.4. Cinética de inibição viral (curva dose-resposta)

Através da CMNT, foi inicialmente estabelecida a curva de dose-resposta, onde a fração GB foi diluída a partir dessa concentração e avaliada de acordo com o método de redução do título viral em relação ao controle. O título viral encontrado em cada concentração foi plotado no gráfico da concentração dos polissacarídeos sulfatados x porcentagem de inibição (PI). A partir desse gráfico foi obtida a concentração efetiva capaz de inibir em 50% a replicação viral (CI₅₀), definida como a concentração requerida para alcançar 50% de proteção contra os efeitos citopáticos provocados pelo vírus. O índice de seletividade (IS) foi determinado pela razão entre CC₅₀/CI₅₀, que corresponde à relação entre a concentração dos

polissacarídeos da fração GB necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% e a concentração de GB capaz de causar 50% de inibição viral.

8.4.5. Mecanismos de ação

Os estudos dos mecanismos de ação foram avaliados através da metodologia de titulação por plaqueamento, que se baseia em diluições logarítmicas (10^{-1} a 10^{-5}) da suspensão viral (Atividade virucida) e dos sobrenadantes (Atividade sobre o receptor celular e Atividade na penetração viral) inoculadas em placas com monocamada confluyente de células Vero. Depois de inoculadas, as células foram incubadas por 60 minutos a 37 °C em ambiente com 5% de CO₂. Passado este período, foi adicionada a carboximetil celulose (1,5% em MEM) e as células incubadas por mais 48 horas. Após, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS pH 7,2, fixadas com formaldeído 4% em PBS e coradas com cristal violeta (1% em PBS).

A percentagem de inibição foi determinada através da comparação entre os títulos vírus na presença (teste) e ausência (controle) das substâncias.

8.4.6. Ensaio de atividade virucida

Para verificar a atividade virucida da fração GB, uma amostra de 100 µL de suspensão viral (10^5 DICT₅₀.mL⁻¹) foi adicionada a 900 µL de polissacarídeos na CMNT ou MEM-Eagle (controle). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 37 °C por 2 horas e em seguida, os títulos residuais dos vírus tratados ou não tratados foram determinados, onde a atividade virucida foi determinada pelo ensaio de redução de formação de placas de vírus em relação ao controle não tratado e expresso como percentagem de inibição.

8.4.7. Ensaio de atividade sobre o receptor celular

Para avaliar a atividade da fração GB sobre o receptor celular, monocamadas de células Vero foram pré-tratadas com GB na MNTC ou MEM-Eagle (controle) por 1h a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com MEM-Eagle, inoculadas com 100 TCID₅₀.mL⁻¹ de suspensão viral e incubadas a 37 °C por 48 horas. Passado este período, o sobrenadante foi coletado e os títulos virais das células tratadas foram determinados, onde a atividade antiviral foi avaliada pelo ensaio de redução de placa de vírus e expresso como percentagem de inibição.

8.4.8. Ensaio de atividade na penetração viral

Para realização do ensaio de atividade de penetração viral, monocamadas de células Vero foram inoculadas com 100 DICT₅₀.mL⁻¹ de suspensões virais e incubadas a 4 °C por 1 hora. Após, as células foram lavadas com MEM-Eagle adicionadas da fração GB (tratamento) ou MEM-Eagle (controle). A temperatura das culturas foi imediatamente elevada para 37 °C e mantida por uma hora para permitir que ocorresse a penetração das partículas virais no interior das células. Após o período de incubação, as monocamadas de células foram lavadas, MEM-Eagle fresco foi adicionado e as culturas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e os títulos virais das células tratadas e não tratadas foram determinados e a atividade antiviral foi avaliada pelo ensaio de redução da placa de vírus e expresso como percentagem de inibição.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. ATIVIDADE MODULADORA DA VASCULARIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. brasiliensis*

9.1.1. Tratamentos realizados na membrana vitelínica (vasculogênese)

Os estudos de vasculogênese foram avaliados utilizando as frações GB, GBH e GBH-S nas concentrações de 10, 40, 80, 160, 240, 320 e 480 µg sobre o processo de vasculogênese da membrana vitelínica (MV) em embriões de *G. domesticus*, considerando-se os eventos primordiais da vascularização. A determinação da modulação da vasculogênese pelas frações GB, GBH e GBH-S foi efetuada a partir da quantificação dos vasos sanguíneos da MV que interceptaram os suportes de metilcelulose (com o auxílio de discos de papel filtro). Heparina na concentração de 80 µg foi utilizada como controle positivo e o fator de crescimento FGFb (*fibroblast growth factor-basic*), na concentração de 50 ng.mL⁻¹ foi empregado como controle negativo. Também foram realizados os tratamentos com suportes contendo apenas metilcelulose 0,45% e água deionizada (controle). Estes controles foram empregados como controle onde a vascularização do embrião encontrava-se em condições normais de desenvolvimento.

As respostas foram expressas como média (n = 8) e desvio padrão da média e calculadas como porcentagem de inibição da vascularização como representado na Tabela 14. No grupo controle, a vascularização média (n = 8) foi de 86,8 vasos (0% de inibição) e a mortalidade dos embriões nestas condições foi de 10% em relação ao total de ovos avaliados. O fator de crescimento promotor da angiogênese empregado como controle negativo (FGFb) induziu a formação de vasos sanguíneos, onde se observou um aumento de 48% da vascularização (128 vasos) em relação ao grupo controle (0% de vascularização - 86 vasos) e a mortalidade foi de aproximadamente 10% dos embriões avaliados. No grupo tratado com o controle positivo heparina (HP) foi observado uma diminuição da vascularização em 58,8%

onde havia apenas 35,4 vasos quando comparados ao grupo controle (0% de vascularização - 86 vasos) e um total de 30% de embriões mortos.

TABELA 14 – ATIVIDADE ANTIVASCULOGÊNICA DAS FRAÇÕES GB, GBH E GBH-S ISOLADAS DE *G. brasiliensis* SOBRE A MEMBRANA DA VESÍCULA VITELÍNICA DE EMBRIÕES DE GALINHA.

| Fração ^a | Concentração (µg) | Número de vasos da MV ^b | % de inibição ^c | % de mortalidade dos embriões |
|---------------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Controle | - | 86,8 ± 4,0 | 0 | 10 |
| GB | 10 | 86,2 ± 4,8 | 0,6 | 10 |
| | 40 | 84,0 ± 4,8 | 3,2 | 10 |
| | 80 | 58,5 ± 4,4 | 32,6 | 29 |
| | 160 | 35,1 ± 4,3 | 59,5 | 45 |
| | 240 | 11,7 ± 4,4 | 86,6 | 89 |
| | 320 | 5,0 ± 3,0 | 94,2 | 92 |
| | 480 | 0 | 100 | 100 |
| Controle | - | 86,8 ± 4,0 | 0 | 10 |
| GBH | 10 | 87,1 ± 3,9 | 0 | 10 |
| | 40 | 85,7 ± 8,2 | 1,2 | 10 |
| | 80 | 58,1 ± 4,8 | 33,0 | 25 |
| | 160 | 49,3 ± 8,1 | 43,2 | 42 |
| | 240 | 30,0 ± 8,7 | 65,4 | 89 |
| | 320 | 11,3 ± 4,1 | 86,9 | 90 |
| | 480 | 5,3 ± 3,2 | 93,9 | 100 |
| Controle | - | 86,8 ± 4,0 | 0 | 10 |
| GBH-S | 10 | 84,7 ± 7,9 | 2,4 | 10 |
| | 40 | 71,5 ± 6,2 | 17,6 | 25 |
| | 80 | 34,7 ± 7,0 | 60,0 | 58 |
| | 160 | 23,0 ± 4,3 | 73,5 | 69 |
| | 240 | 7,5 ± 2,0 | 91,3 | 90 |
| | 320 | 0 | 100 | 100 |
| | 480 | 0 | 100 | 100 |
| HP ^d | 80 | 35,3 ± 4,7 | 58,8 | 30 |
| Controle + | | | | |
| | | | % de aumento da vascularização | |
| FGFb ^e | 50 ng.mL ⁻¹ | 128 ± 12,9 | 48 | 10 |
| Controle - | | | | |

^a GB = fração bruta, GBH = fração purificada, GBH-S = produtos de degradação controlada de Smith; ^b número de vasos da membrana da vesícula vitelínica que interceptaram o disco de papel filtro e desvio padrão (n = 8); ^c percentagem de inibição em relação ao controle (metilcelulose 0,45% e água deionizada); ^d HP = heparina porcina empregada como controle positivo; ^e FGFb = fator de crescimento empregado como controle negativo.

A fração bruta GB foi potencialmente ativa e inibiu a formação da vascularização da MV de forma dependente da concentração. Esses resultados são discutidos a seguir em maiores detalhes.

A Figura 28 apresenta o número de vasos sanguíneos da MV em função da concentração dos polissacarídeos presentes na fração GB, sendo estes resultados comparados ao controle (0% de inibição - 86 vasos). A análise através da contagem do número de vasos mostrou que não houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre as concentrações de 10 e 40 μg da fração GB, estas concentrações também não foram efetivas na MV inibindo a formação de vasos quando comparadas ao controle (0% de inibição - 86 vasos). O efeito antivasculogênico significativo da fração GB foi detectado em 32% (58,5 vasos) quando se utilizou a concentração de 80 μg .

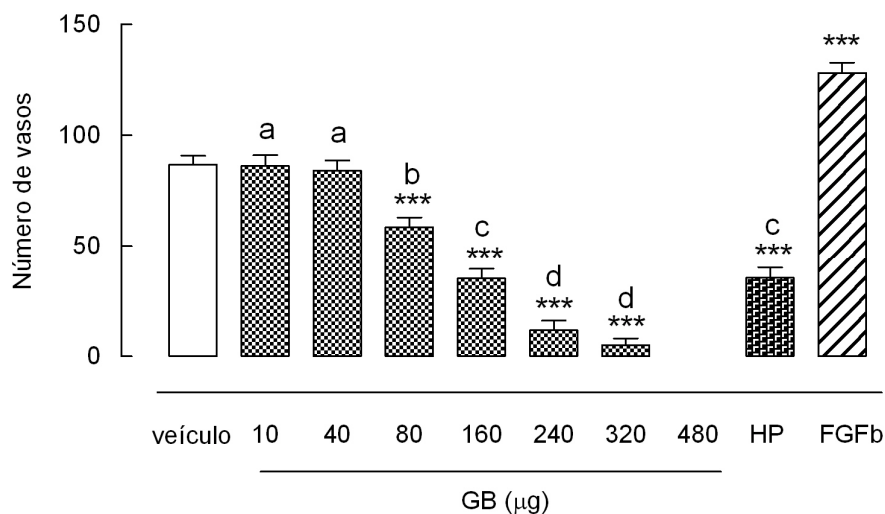


FIGURA 28 – NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE *G. domesticus* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GB. Veículo: controle; Controle positivo: HP (80 μg) e controle negativo: FGfB (50 ng.mL^{-1}).

*** Diferenças significativas ao nível de $p < 0,001$ em relação ao controle (ANOVA seguido de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de GB e HP ($p < 0,01$).

Nota-se ainda na Figura 28 que um efeito mais pronunciado da fração GB foi na concentração de 160 µg, onde a inibição da formação dos vasos sanguíneos foi de 59,5% (31,5 vasos) com uma taxa de mortalidade aproximada dos embriões de 50%. Estatisticamente, este resultado não foi diferente do controle positivo HP (35,3 vasos – 58,8% de inibição) como pode ser observado nos detalhes da letra “c” na Figura 27. Desta forma, para se obter o mesmo efeito de HP sobre a vascularização da MV, 160 µg da fração GB foi necessária. Também não houve diferença significativa quanto à formação de vasos na MV entre as concentrações de 240 e 320 µg, onde as percentagens de inibição foram de 86,6% (11,5 vasos) e 94,2 % (5 vasos) respectivamente. Nestas concentrações (240 e 320 µg) houve uma alta taxa de mortalidade, onde aproximadamente 90% dos embriões estavam mortos.

Quando se utilizou a concentração de 480 µg da fração GB ocorreu uma inibição de 100% dos vasos sanguíneos e a mesma percentagem de mortalidade foi observada. Por isso, não foram utilizadas concentrações superiores a essa para a fração GB neste estudo (FIGURA 28).

A Figura 29 apresenta o número de vasos sanguíneos da MV em função da concentração dos polissacarídeos presentes na fração GBH, sendo estes resultados comparados ao controle (0% de inibição - 86 vasos). A taxa de mortalidade dos embriões para a fração GBH foi similar aos encontrados para a fração GB nas mesmas concentrações.

Como observado nos resultados da fração GB, não houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre as concentrações de 10 e 40 µg da fração GBH e neste estudo estas concentrações também não foram efetivas na MV inibindo a formação de vasos, quando comparadas ao controle (0% de vascularização - 86 vasos). A efetividade da fração GBH sobre a vascularização foi observada a partir da concentração de 80 µg, onde ocorreu uma percentagem de 32% de inibição (58,5 vasos) da formação dos vasos na MV em relação ao controle (0% de inibição - 86 vasos) (FIGURA 29).

Como demonstrado na Figura 29, a fração GBH não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 80 e 160 µg, e entre as concentrações de 320 e 480 µg quanto à inibição dos vasos. Também não houve diferença significativa entre a fração GBH na concentração de 240 µg (30 vasos - 65,4% de inibição) e HP. Portanto, para se obter o mesmo efeito antivasculogênico

na MV de HP (58,8% de inibição), uma concentração 3 vezes maior da fração GBH (240 μg = 65,4% de inibição) é necessária.

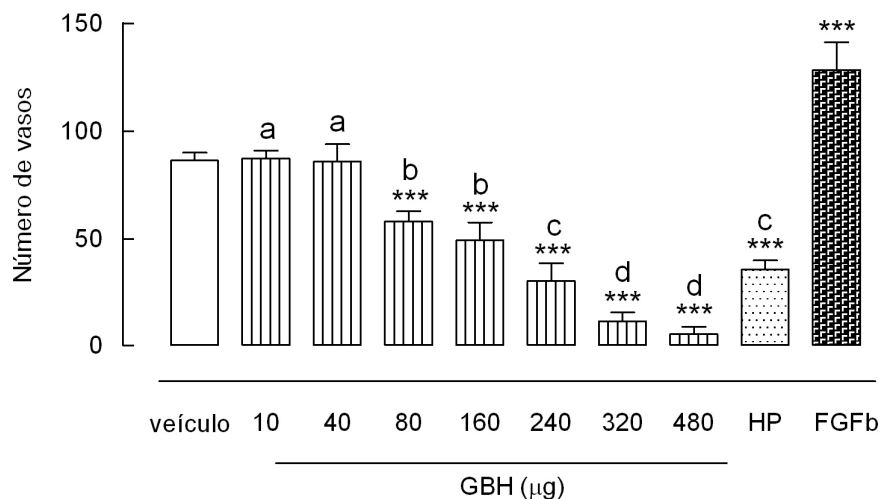


FIGURA 29 – NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE *G. domesticus* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GBH. Veículo: controle; Controle positivo: HP (80 μg) e controle negativo: FGFb (50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).

*** Diferenças significativas ao nível de $p < 0,001$, em relação ao controle (ANOVA seguido de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de GBH e HP ($p < 0,01$).

Quanto aos resultados de atividade antivasculogênica das frações GB e GBH, pode-se notar que uma concentração maior de GBH (240 μg) é necessária para se obter o mesmo efeito de GB na concentração de 160 μg (59,5% de inibição - 31,5 vasos). Deste modo, a fração bruta GB foi mais efetiva que a fração GBH quanto a inibição dos vasos sanguíneos da MV de embriões de galinha.

Dando continuidade aos estudos de vasculogênese na membrana da vesícula vitelínica a Figura 30 representa o número de vasos em função da fração obtida por degradação controlada de Smith (GBH-S) no tratamento de quatro dias de desenvolvimento embrionário em relação ao controle.

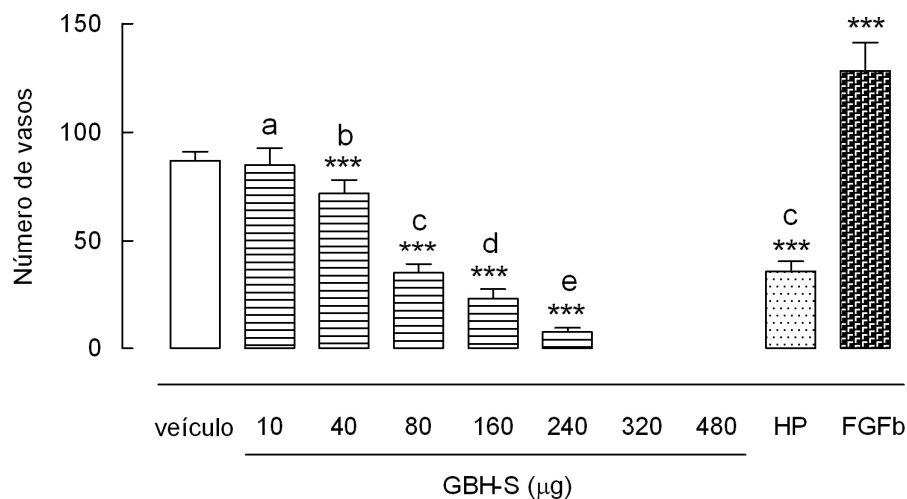


FIGURA 30 – NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE *G. domesticus* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GBH-S. Veículo: controle; Controle positivo: HP (80 μg) e controle negativo: FGFb (50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).

*** Diferenças significativas ao nível de $p < 0,001$, em relação ao grupo controle negativo (ANOVA seguido de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de GBH-S e HP ($p < 0,01$).

Na Figura 30 pode-se notar que a partir da concentração de 40 μg , a fração GBH-S já foi efetiva inibindo a formação de vasos na MV em 17,6% (71,5 vasos) em relação ao controle (0% de inibição - 86 vasos). Todas as concentrações testadas foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,001$).

Neste estudo, a fração GBH-S foi mais efetiva em comparação às frações GB e GBH, onde 60% de inibição (34,7 vasos) da formação dos vasos MV é observada quando se aplicou a concentração de 80 μg de GBH-S. Sendo assim, essa fração é igualmente ativa à HP (35,4 vasos - 58,8% de inibição) nas mesmas concentrações.

As taxas de mortalidade dos embriões, quando tratados com a fração GBH-S, foram de 10, 25, 58, 69, 90, 100 e 100% para as concentrações de 10, 40, 80, 160, 240, 320 e 480, respectivamente. O aumento da mortalidade dos embriões de *G. domesticus* frente às maiores concentrações dos polissacarídeos testados (GB, GBH e GBH-S) parece estar ligado ao efeito antivasculogênico destes polímeros. A diminuição da vascularização pode causar indisponibilidade de nutrientes necessários para o desenvolvimento normal do embrião.

Os resultados de atividade antivasculogênica na MV foram captados através de câmara fotográfica acoplada ao microscópio estereoscópico, e as fotografias estão mostradas na Figura 31 para melhor entendimento da ação destes polissacarídeos sobre a MV de embriões de *G. domesticus*.

A Figura 31 ilustra a ação antivasculogênica das frações GB e GBH-S na MV quando comparadas ao controle (FIGURA 31A). A fração GB na concentração de 80 μg inibiu a formação dos vasos sanguíneos da MV (FIGURA 31B). Na concentração de 320 μg essa ação foi visivelmente mais acentuada, onde há presença de poucos vasos sanguíneos (FIGURA 31E).

Ainda na Figura 31C, observa-se que fração GBH-S, na concentração de 80 μg inibiu significativamente a vasculogênese e na concentração de 160 μg não se observa mais a presença de vasos sanguíneos na MV.

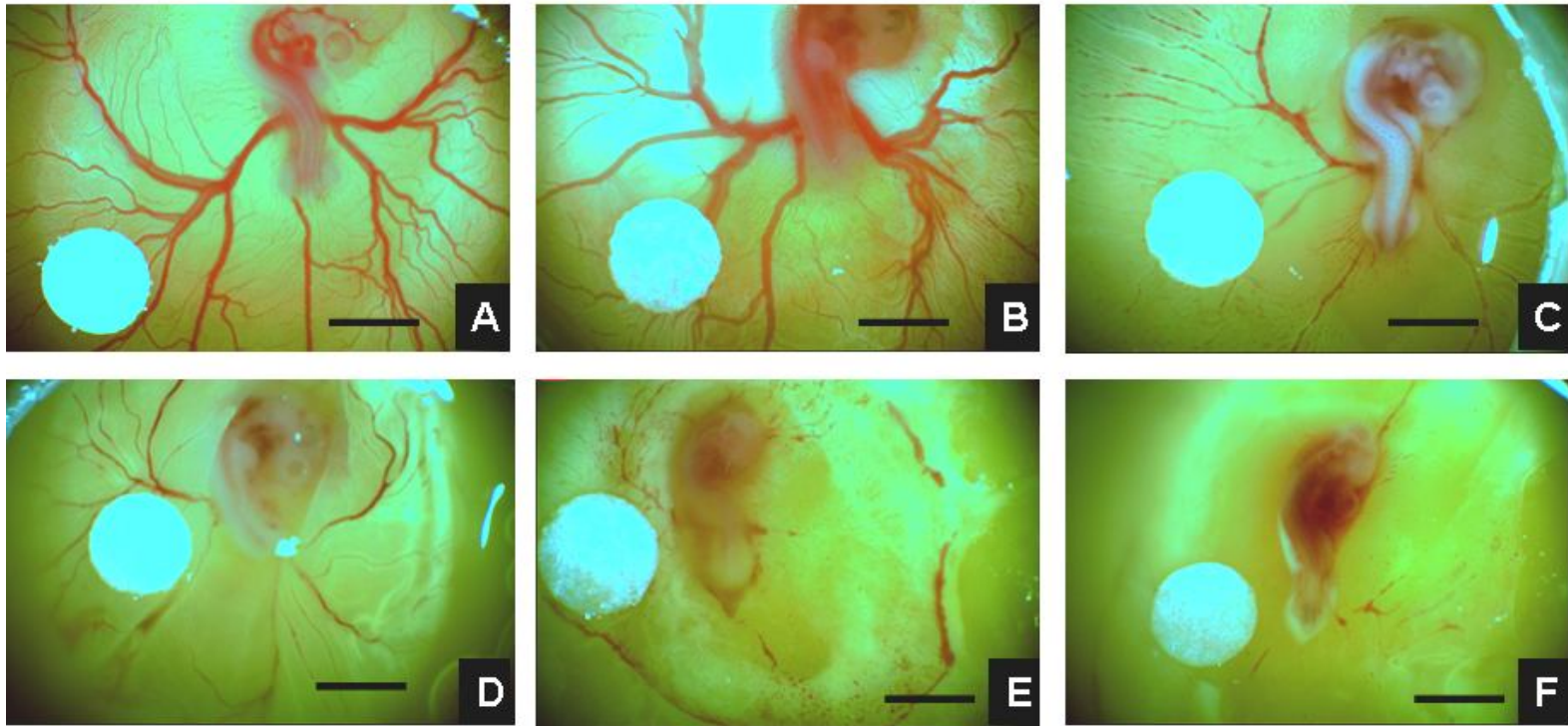


FIGURA 31 – FOTOGRAFIAS DOS VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE EMBRIÕES DE *G. domesticus* COM QUATRO DIAS DE DESENVOLVIMENTO.

(A) Controle (metilcelulose e água); (B) Tratamento com 80 µg de GB; (C) Tratamento com 80 µg de GBH-S; (D) Tratamento com 80 µg de HP; (E) Tratamento com 320 µg de GB e (F) Tratamento com 160 µg de GBH-S. Barra = 4mm.

Com o objetivo de avaliar a ação dos polissacarídeos das frações GB, GBH e GBH-S sobre o fator de crescimento foram realizados experimentos de aplicação simultânea destas frações com o fator de crescimento indutor da vascularização FGFb. Estes resultados estão demonstrados na Figura 32.

Na Figura 32, o tratamento somente com FGFb promoveu um aumento na vascularização em torno do disco de metilcelulose, onde se observou um aumento de 48% (128 vasos) em relação ao controle (0% de inibição - 86 vasos). No entanto, esse efeito foi diminuído, quando se realizou a aplicação simultânea de FGFb (50 ng.mL⁻¹) e as frações GB, GBH e GBH-S (160 µg).

A Figura 32A representa o número de vasos sanguíneos em função dos tratamentos controle (metilcelulose 0,45% e água), GB (160 µg), GB (160 µg) + FGFb (50 ng.mL⁻¹) e FGFb (50 ng.mL⁻¹). A aplicação conjunta de GB e FGFb ocasionou uma diminuição da vascularização em 41,4% (53 vasos) em relação ao tratamento somente com o FGFb (128 vasos). Ademais, quando a MV foi tratada simultaneamente com GB e FGFb (75 vasos) não houve diferença significativa do grupo tratado com o controle (86,8 vasos).

Analisando a Figura 32B pode-se observar que aplicação simultânea de GBH e FGFb ocasionou uma diminuição da vascularização em 27,9% (35,8 vasos) em relação ao tratamento realizado somente com o FGFb (128 vasos). Os resultados do tratamento conjunto de GBH e FGFb (92,2 vasos) também não foram estatisticamente diferentes do controle (86,8 vasos).

A aplicação dos produtos de degradação controlada de Smith (fração GBH-S) com FGFb ocasionou uma diminuição de 53% (67,9 vasos) da vascularização da MV e este resultado foi estatisticamente diferente do controle (86,8 vasos) (FIGURA 32C).

Estes resultados sugerem que os polissacarídeos sulfatados presentes nas frações GB, GBH e GBH-S bloqueiam de alguma forma a capacidade do FGFb de induzir a formação de novos vasos na MV de embriões de *G. domesticus*.

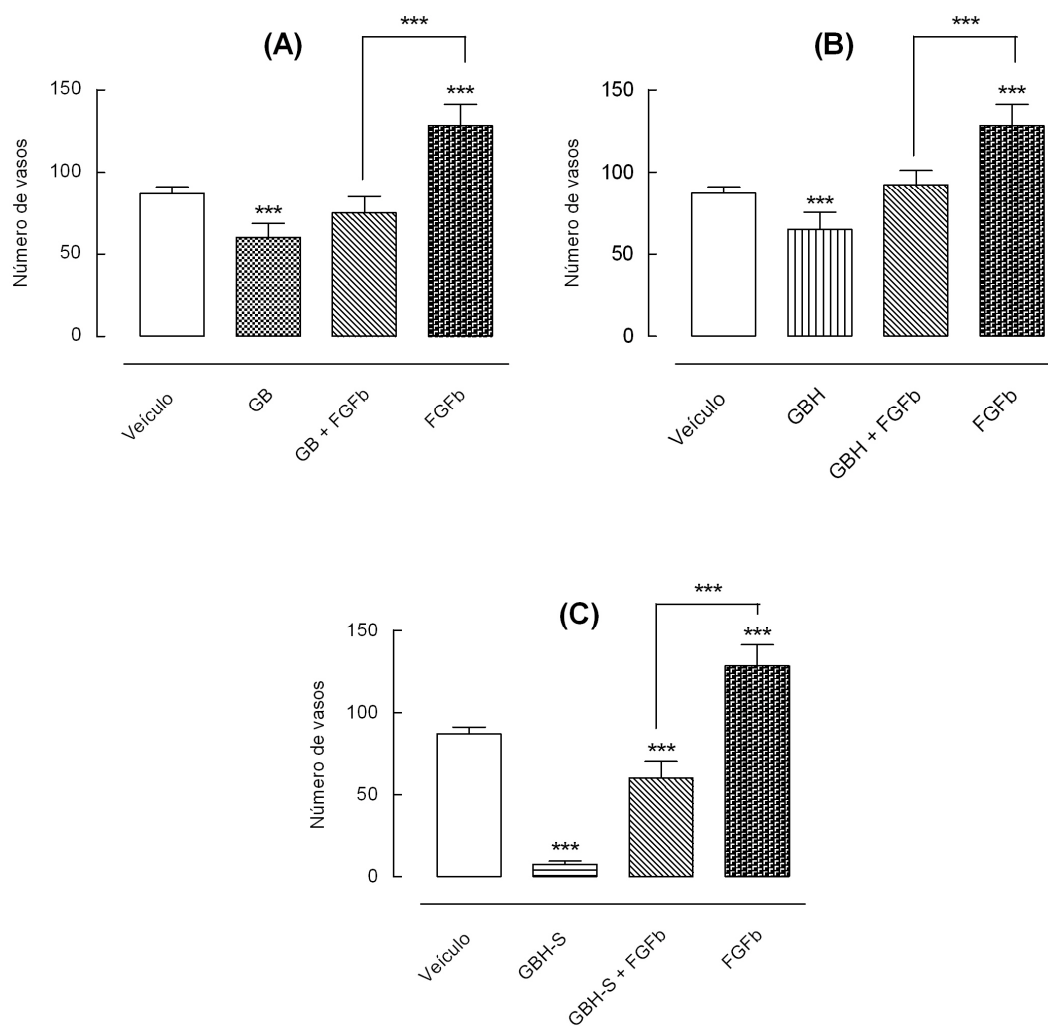


FIGURA 32 – NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MV DE EMBRIÕES DE *G. domesticus* DEMONSTRANDO O EFEITO DAS FRAÇÕES GB, GBH E GBH-S SOBRE FGFb.

Os tratamentos foram realizados apenas com as frações (160 µg); Simultaneamente com as frações e FGFb (50 ng.mL⁻¹) e somente com FGFb (50 ng.mL⁻¹). *** Diferenças significativas ao nível de p < 0,001, em relação ao grupo controle (veículo) (ANOVA seguido de Tukey). (A) GB, (B) GBH e (C) GBH-S.

9.1.2. Tratamentos realizados na membrana corioalantóica (angiogênese)

O ensaio da angiogênese na membrana corioalantóica (CAM-assay) é um modelo *in vivo* amplamente utilizado para estudar o desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes em embriões (FOLKMAN, 1971; JAKOB *et al.*, 1978; MCCORMICK *et al.*, 1984; VU *et al.*, 1985; NGUYEN *et al.*, 1994; IRUELA-ARISPE *et al.*, 1995; DIAS *et al.*, 2008).

Os estudos de angiogênese deste trabalho foram realizados utilizando as frações GB e GBH-S nas concentrações de 40, 80, 160, 320 e 480 µg e 40, 80, 160 e 320 µg respectivamente. Este ensaio foi avaliado sobre o processo de angiogênese da membrana corioalantóica (MC) em embriões de *G. domesticus*, considerando-se a vascularização formada a partir dos vasos pré-existentes. A determinação da modulação da angiogênese pelas frações GB e GBH-S foi efetuada a partir da quantificação dos vasos sanguíneos da MC que interceptaram os suportes de metilcelulose (com o auxílio de discos de papel filtro). Heparina na concentração de 80 µg foi utilizada como controle positivo e o fator de crescimento FGFb (*fibroblast growth factor-basic*), na concentração de 50 ng.mL⁻¹ foi empregado como controle negativo. Também foram realizados os tratamentos com suportes contendo apenas metilcelulose 0,45% e água deionizada (controle). Estes controles foram empregados como controle onde a vascularização do embrião encontrava-se em condições normais de desenvolvimento.

Os resultados foram expressos em percentagem a partir da contagem do número de vasos da MV após os tratamentos e correlacionados ao grupo controle (vascularização normal da MC) e estão apresentados na Tabela 15. Como no processo de vasculogênese, pode-se notar que neste estudo de angiogênese, a fração constituída pelos produtos de degradação controlada de Smith (GBH-S) foi mais efetiva quanto à inibição da vascularização. Os tratamentos realizados com 320 µg de GB ocasionaram uma inibição de 89,6% da vascularização (7,1 vasos) em relação ao número de vasos na MC dos embriões não tratados (controle). Efeito similar de inibição dos vasos foi observado quando se aplicou uma concentração menor de GBH-S (160 µg – 7,1 vasos) sobre a MC.

TABELA 15 – ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA DAS FRAÇÕES GB E GBH-S ISOLADAS DE *G. brasiliensis* SOBRE A MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE EMBRIÕES DE GALINHA.

| Fração ^a | Concentração (µg) | Número de vasos da MC ^b | % de inibição ^c | % de mortalidade dos embriões |
|---------------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Controle | - | 68,9 ± 1,8 | 0 | 10 |
| GB | 40 | 60,8 ± 6,0 | 11,7 | 19 |
| | 80 | 46,0 ± 3,1 | 33,2 | 17 |
| | 160 | 34,5 ± 6,5 | 49,9 | 23 |
| | 320 | 7,1 ± 4,7 | 89,6 | 20 |
| | 480 | 0 | 100 | 20 |
| Controle | - | 68,9 ± 1,8 | 0 | 10 |
| GBH-S | 40 | 44,7 ± 3,2 | 35,1 | 29 |
| | 80 | 18,6 ± 2,0 | 73,0 | 19 |
| | 160 | 7,0 ± 4,2 | 89,8 | 18 |
| | 320 | 0 | 100 | 28 |
| HP ^d | 80 | 22,7 ± 2,6 | 67,0 | 31 |
| Controle + | | | | |
| | | | % de aumento da vascularização | |
| FGFb ^e | 50 ng.mL ⁻¹ | 96,0 | 39,3 | 14 |
| Controle - | | | | |

^a GB = fração bruta, GBH-S = produtos de degradação controlada de Smith; ^b número de vasos da membrana corioalantóica que interceptaram o disco de papel filtro e desvio padrão (n = 8); ^c percentagem de inibição em relação ao controle (metilcelulose 0,45% e água); ^d HP = heparina porcina empregada como controle positivo; ^e FGFb = fator de crescimento empregado como controle negativo.

Estes resultados podem ser observados na Figura 33 que mostra o número de vasos sanguíneos da MC em função das diferentes concentrações das frações GB (FIGURA 33A) e de GBH-S (FIGURA 33B) em relação ao grupo não tratado controle (68 vasos – 0% de inibição) em embriões com oito dias de desenvolvimento.

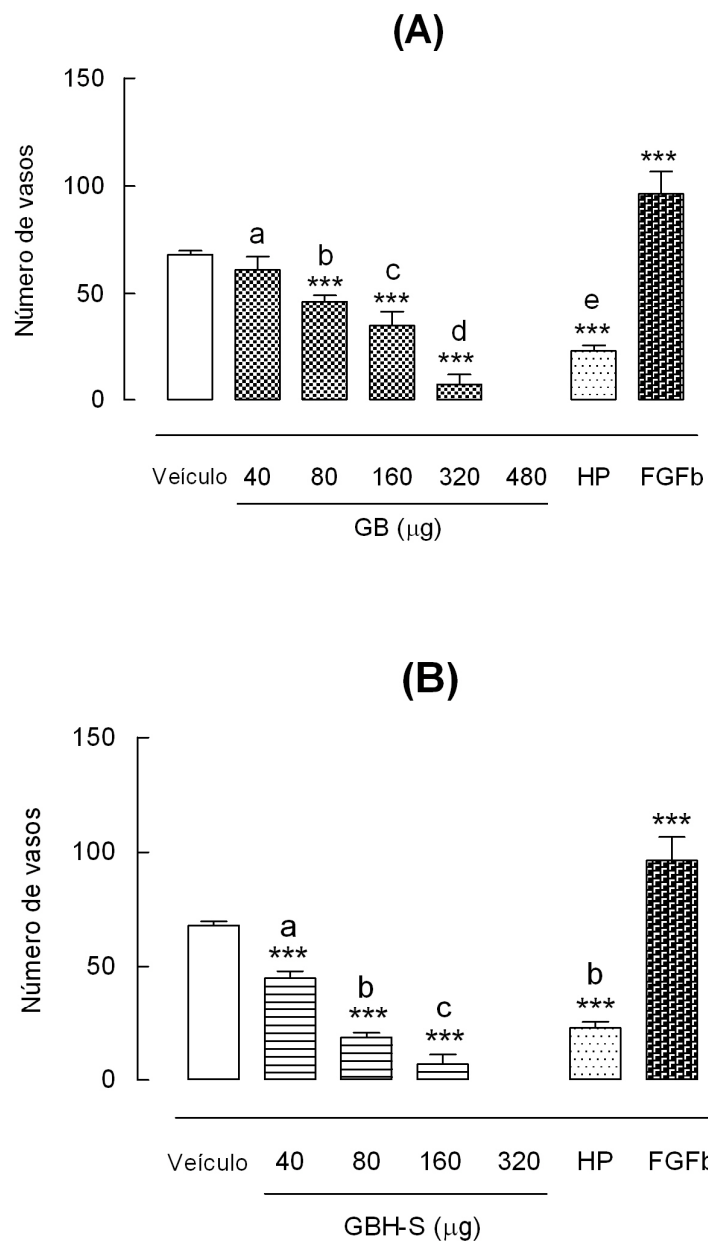


FIGURA 33 – NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MC DE EMBRIÕES DE *G. domesticus* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GB e GBH-S, Controle positivo: HP (80 µg) e controle negativo: FGFb (50 ng.mL⁻¹).

*** Diferenças significativas ao nível de $p < 0,001$, em relação ao controle (veículo) (ANOVA seguido de Tukey). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de GB, GBH-S e HP ($p < 0,01$).

Analisando os resultados apresentados na Figura 33 verifica-se que tanto a fração bruta (GB) como a fração constituída pelos produtos de degradação controlada de Smith (GBH-S) foram potencialmente ativas e inibiram a formação da vascularização da MC de forma dependente da concentração. O fator da angiogênese FGFb induziu a formação de vasos sanguíneos, onde se observou um aumento na vascularização de 39,3% (96,3 vasos) em relação ao grupo controle negativo (68,9 vasos) e HP na concentração de 80 µg inibiu a vascularização em 67,0% (22,7 vasos).

Através dos resultados apresentados na Figura 33A, pode-se observar que a fração GB na concentração de 80 µg já foi efetiva, onde se observou uma inibição de 33,2% (46 vasos) dos vasos na MC em relação ao controle (68,9 vasos). Na concentração de 160 µg de GB houve inibição de 89,6% dos vasos sanguíneos e na maior concentração dessa fração (480 µg) houve 100% de inibição.

Analisando os resultados apresentados na Figura 33B, observa-se que a fração GBH-S na concentração de 40 µg ocasionou inibição significativa dos vasos sanguíneos, em 35% (44,7 vasos) em relação ao controle (68 vasos). E na maior concentração de GBH-S testada (320 µg) ocorreu uma inibição de 100% da vascularização.

Ainda na Figura 33, se observa que a fração GBH-S, na concentração de 80 µg, não foi significativamente diferente da fração HP na mesma concentração. Portanto, neste estudo a fração GBH-S é igualmente efetiva à HP, na concentração de 80 µg. No entanto, para a fração GB, uma concentração 2 vezes maior é necessária para se observar esse mesmo efeito. Isto demonstra uma maior efetividade de inibição da angiogênese da fração GBH-S em relação à fração GB.

Desta forma, os resultados apresentados na Figura 33 demonstram que tanto a GB como a GBH-S inibiram a formação dos vasos sanguíneos na MC, de acordo com o observado nos resultados do ensaio da MV (vasculogênese).

Os resultados do presente estudo mostraram que quando as frações polissacarídicas GB e GBH-S foram administradas, estes tratamentos promoveram um importante efeito antiproliferativo da vascularização na membrana da vesícula vitelínica e na membrana corioalantóica de embriões de *G. domesticus*, evidenciado pela diminuição do número de vasos.

Em maiores detalhes, a Figura 34 ilustra a MC de embriões de *G. domesticus* tratada com a fração GBH-S (320 µg) em comparação ao controle (metilcelulose e

água). Após a administração de GBH-S é visível o seu efeito inibitório sobre a vascularização da MC, enquanto que no tratamento controle o desenvolvimento da vascularização continua normalizado até o oitavo dia de desenvolvimento. Essa diferença é facilmente evidenciada pelo tamanho do alantoide (anexo embrionário altamente vascularizado que está ligado ao intestino posterior do embrião, armazenando os produtos de excreção até o nascimento e auxiliando nas trocas gasosas do embrião com o meio externo).

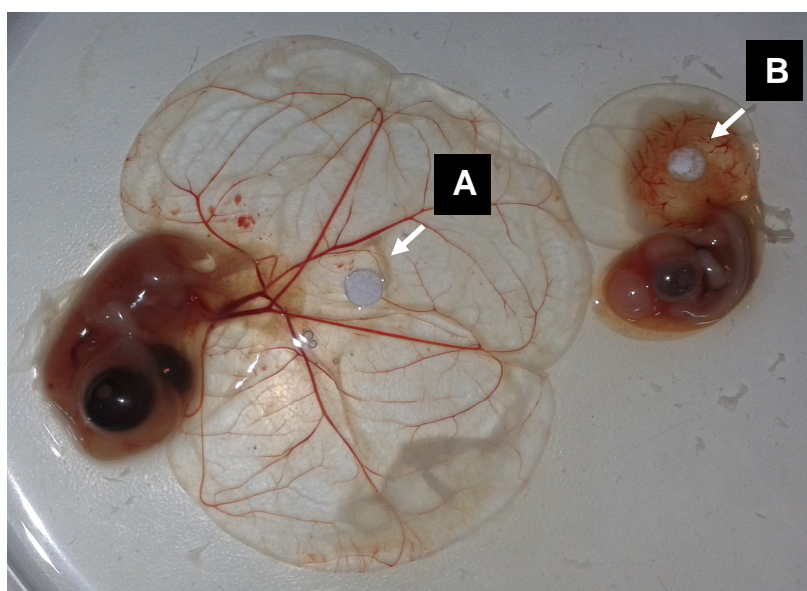


FIGURA 34 – FOTOGRAFIAS DE EMBRIÕES E DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE *G. domesticus* DE OITO DIAS DE DESENVOLVIMENTO.

(A) MC tratada com o controle (metilcelulose e água) e detalhe da seta na região onde foi implantado o disco de metilcelulose, sobreposto pelo disco de papel filtro; (B) Tratamento com GBH-S (320 µg) e detalhe da seta na região onde foi implantado o disco de metilcelulose, sobreposto pelo disco de papel filtro.

A ação antiangiogênica das heteroramnanas presentes nas frações GBH-S (na concentração de 80 µg) e GB (concentração de 160 µg), em comparação ao tratamento controle estão ilustradas na Figura 35. Detalhadamente, a Figura 35A mostra a MC tratada com o controle (metilcelulose e água), onde a vascularização está normalizada. Analisando a Figura 35B apresenta a MC tratada com 80 µg de

GBH-S, a vascularização foi inibida e a capacidade de inibição desses polissacarídeos parece se estender para os outros componentes do embrião, a exemplo da MV. O mesmo se observa quando se aplicou 160 μg de GB na Figura 35C.

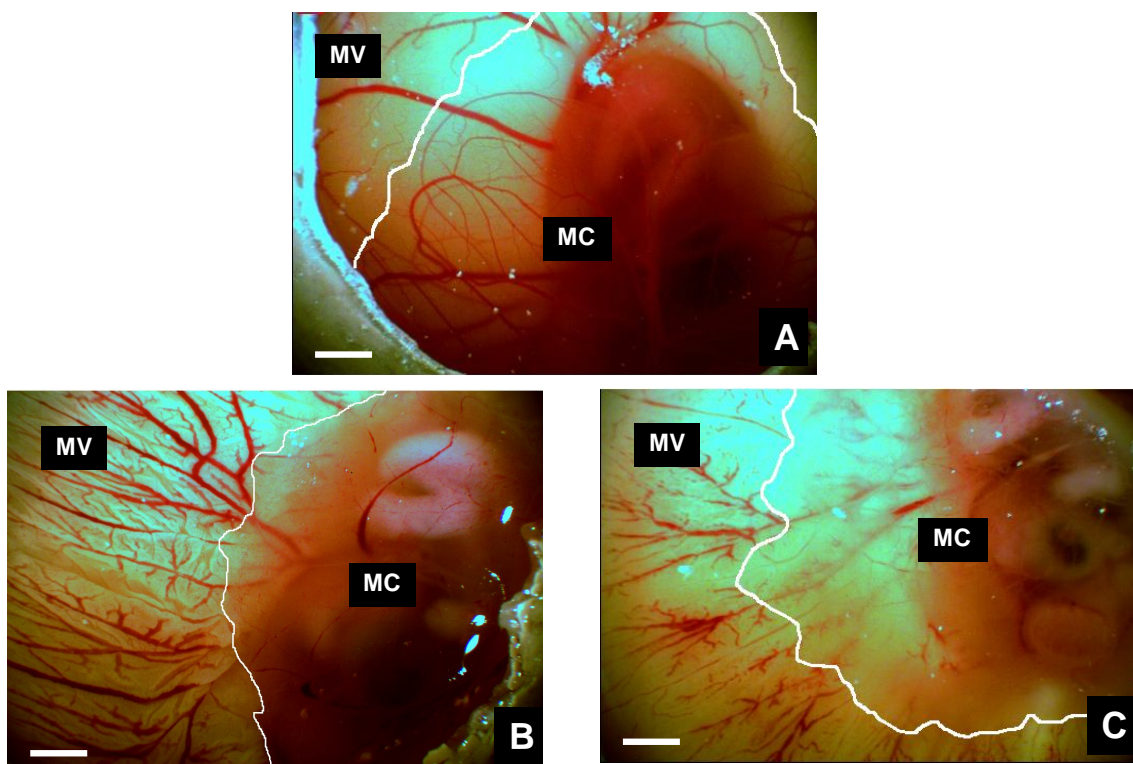


FIGURA 35 – FOTOMICROGRAFIAS DOS VASOS SANGUÍNEOS DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA DE *G. domesticus* DE OITO DIAS DE DESENVOLVIMENTO.

(A) Controle (metilcelulose e água); (B) Tratamento com 80 μg de GBH-S e (C) Tratamento com 160 μg de GB. MV = Membrana da vesícula vitelínica e MC = Membrana corioalantóica. Barra = 1,5 mm.

Os embriões de *G. domesticus* submetidos ao ensaio de angiogênese na MV foram avaliados quanto à taxa de mortalidade. Os ovos que sofreram contaminação após os tratamentos foram descartados e não foram incluídos nos cálculos de mortalidade. Os embriões submetidos ao tratamento com o controle apresentaram uma percentagem de mortalidade de aproximadamente 15%. Distintamente dos embriões submetidos ao ensaio de vasculogênese, que apresentaram uma alta taxa

de mortalidade, os embriões submetidos aos tratamentos com as frações GB, GBH-S, HP e FGFb no processo de angiogênese em MC apresentaram mortalidade em torno de 20%, 24%, 31% e 14%, respectivamente. Essa diferença de mortalidade pode estar ligada ao fato que os embriões que foram submetidos ao ensaio de angiogênese (6 dias de incubação), encontravam-se mais desenvolvidos em relação aos embriões submetidos a metodologia de vasculogênese (2 dias de incubação), devido ao maior tempo de incubação.

Como observado através do processo de vasculogênese, no ensaio de angiogênese o tratamento somente com o fator de crescimento angiogênico FGFb, também promoveu um aumento na vascularização em torno do disco de metilcelulose (39,3% - 96,3 vasos) em relação ao controle (68,9 vasos). Pode-se notar na Figura 36 que este efeito foi diminuído em aproximadamente 50% quando se realizou a aplicação simultânea de FGFb e a fração polissacarídica GBH-S na concentração de 160 µg. Em resumo, as heteroramnanas sulfatadas presentes na fração GBH-S preveniram de alguma forma o efeito indutor da vascularização do FGFb.

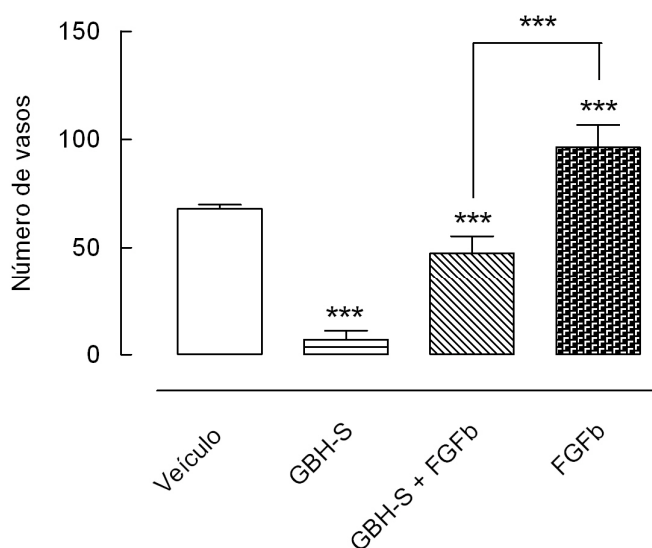


FIGURA 36 – NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS DA MC DE EMBRIÕES DE *G. domesticus* DEMONSTRANDO O EFEITO DA FRAÇÃO GBH-S SOBRE FGFb.

Os tratamentos foram realizados apenas com a fração GBH-S (160 µg); Simultaneamente com GBH-S e FGFb (50 ng.mL⁻¹) e somente com FGFb (50 ng.mL⁻¹). *** Diferenças significativas ao nível de p < 0,001, em relação ao grupo controle (veículo) (ANOVA seguido de Tukey).

O mecanismo de ação das heteroramnanas sulfatadas presentes nas frações GB e GBH-S sobre a vascularização permanece em parte desconhecido. No entanto, algumas hipóteses são descritas com o objetivo de esclarecer a atividade antiangiogênica de polissacarídeos sulfatados obtidos de fontes marinhas, a exemplo das fucanas sulfatadas e das galactanas sulfatadas (KOYANAGI *et al.*, 2003; CUMASHI *et al.*, 2007; POMIN, 2012).

9.1.3. Mecanismo de ação das heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis* sobre a vascularização

De um modo geral, a atividade de inibição da vascularização apresentada por polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas ocorre através da capacidade destes compostos interferirem nas ligações específicas de alguns fatores angiogênicos, principalmente os VEGFs (KOYANAGI *et al.*, 2003) e o FGFb (SOEDA *et al.*, 2000; POMIN, 2012). No processo de angiogênese, células do mesoderma necessitam da disponibilidade de FGFb para que ocorra a formação dos angioblastos. Nesta etapa, ocorre também a diferenciação dos angioblastos e a formação de um novo tubo vascular mediado por moléculas de VEGF (POMIN, 2012). Através de ligações eletrostáticas, fucanas e galactanas sulfatadas são capazes de se ligar às moléculas FGFb e VEGF impedindo o evento de formação de novos vasos, visto que estes indutores estariam impedidos de se ligarem aos seus respectivos receptores de membrana, os FGFRs e VEGFs (KOYANAGI *et al.*, 2003; CUMASHI *et al.*, 2007; POMIN, 2012).

No presente trabalho, as heteroramnanas sulfatadas inibiram a vascularização na MV e na MC de embriões de *G. domesticus*. Uma hipótese é que estes polímeros altamente sulfatados estariam impedindo a ligação das moléculas angiogênicas (VEGF e FGFb) aos seus respectivos receptores de membrana através de ligações eletrostáticas, assim como descrito para as fucanas e as galactanas sulfatadas (KOYANAGI *et al.*, 2003; CUMASHI *et al.*, 2007). Ademais, esse mecanismo pode ser aceito para os processos de vasculogênese e angiogênese, visto que os mesmos fatores (VEGF e FGFb) estão envolvidos nos primórdios da vascularização e na

formação de vasos a partir de vasos pré-existentes (DIAS *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2008).

Pomin (2012) descreve que a neovascularização fisiopatológica (crescimento de tumores através da formação de novos vasos) é possível devido a capacidade das células tumorais sintetizarem moléculas VEGF e FGFb. Desta forma, as heteroramnanas sulfatadas obtidas de *G. brasiliensis* poderiam prevenir a ligação destes indutores aos seus receptores específicos impedindo a neovascularização.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a aplicação simultânea do FGFb e das heteroramnanas sulfatadas presentes na fração GBH-S ocasionou uma diminuição da vasculogênese/angiogênese, o que comprova a ação destes polímeros sobre o FGFb. Este processo pode estar correlacionado ao sequestro de FGFb por estes polissacarídeos sulfatados, o que previne a ligação de FGFb aos receptores, inibindo assim, a formação de novos vasos sanguíneos. Este tipo de mecanismo está de acordo com a proposta para a ação de fucanas sulfatadas sobre a vasculogênese e a angiogênese, isoladas da alga parda *Sargassum sthenophyllum* (KOYANAGI *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2008). Contudo, não está claro se o mecanismo de ação dos polissacarídeos das frações GB, GBH e GBH-S é devido ao mecanismo de sequestro de FGFb ou de interferência na ação de outros fatores de crescimento como o VEGF.

As características estruturais da fração GBH-S quanto ao alto grau de sulfatação (38,2%), massa molar e composição monossacarídica (Ram = 78,2%, Xil = 1,9 e Glc = 19,8%) podem estar ligadas à maior atividade de inibição da formação de vasos sanguíneos destes polissacarídeos, observada nos ensaios de vasculogênese e angiogênese. O grau de sulfatação dos polissacarídeos é descrito como o principal fator na atividade antiangiogênica destes polímeros (POMIN, 2012). Polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marrons tiveram sua atividade antiangiogênica (avaliada em células endoteliais do cordão umbilical) diminuída quando estes grupos carregados negativamente foram substituídos por substituintes não carregados (CUMASHI *et al.*, 2007).

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, as heteroramnanas sulfatadas obtidas de *G. brasiliensis* são potenciais como agentes antiangiogênicos, podendo em um futuro próximo serem empregados na clínica médica.

9.2. ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. brasiliensis*

Os polissacarídeos obtidos de *G. brasiliensis* foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade em células humanas tumorais com o objetivo de avaliar o potencial antitumoral desses compostos. Nesse ensaio, foi utilizada a linhagem de glioma humano (U87MG, classificada em grau diferenciado de progressão maligna). As frações GBH e os produtos de degradação controlada de Smith, GBH-S foram submetidas a esta avaliação.

9.2.1. Análise da viabilidade de células tumorais

O ensaio de citotoxicidade foi realizado através de viabilidade celular pelo MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio) para investigar a atividade antitumoral das heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis* (MOSSMANN, 1983), onde a dosagem da atividade metabólica de células viáveis é determinada através de ensaio colorimétrico. Os sais tetrazólio formam o sal formazana que é hidrofóbico e possui coloração (solubilizado em DMSO) sendo quantificados por espectrofotometria. Isso é possível devido à redução dos sais *tetrazolium* através da reação enzimática que envolve a oxidação do NADH/NADPH catalisada pelo complexo *succinato-tetrazolium* redutase que está presente nas células viáveis.

As células de astrocitoma foram submetidas às frações GBH e GBH-S por 24 e 48 horas nas concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após foi realizada a dosagem da atividade metabólica através do método MTT.

9.2.2. Viabilidade celular de células U87MG após tratamento com polissacarídeos por 24 e 48 horas

A Figura 37 apresenta os resultados de viabilidade celular por 24 e 48 horas após o tratamento das células U87MG com os polissacarídeos. No tempo de 24 horas, o tratamento da linhagem U87MG com as frações polissacarídicas GBH e

GBH-S não reduziram a viabilidade celular nas concentrações utilizadas (FIGURA 37A).

A Figura 37B demonstra o tratamento das células U87MG com os diferentes polissacarídeos pelo tempo de 48 horas. Verificou-se que tanto a fração GBH, como a fração GBH-S, proporcionaram redução significativa na viabilidade celular, em todas as concentrações utilizadas, quando comparadas às células mantidas na condição controle. Especificamente, a diminuição de viabilidade das células tumorais pela fração GBH foi de 33,3%, 47,2% e 54,9% nas concentrações de 25, 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Em relação ao tratamento pelo tempo de 48 horas das células tumorais com a fração GBH-S, a concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a mais efetiva, onde se observou uma redução da viabilidade celular em 69% em relação ao grupo controle. Nas concentrações de 25 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a diminuição da viabilidade celular foi de 23,4% e 52,3% respectivamente.

É importante notar que, quando se utilizou a concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de GBH (54,9% de redução da viabilidade celular) a diminuição da viabilidade celular foi equiparável à fração GBH-S, na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (52,3% de redução da viabilidade celular). Apesar da diferença não ser estatisticamente significativa, na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a fração GBH foi mais efetiva e a diminuição da viabilidade celular foi de 33,3%, enquanto a fração GBH-S promoveu uma diminuição de 23,4% nessa mesma concentração (Figura 37B).

Verifica-se que as frações GBH e GBH-S diminuíram a viabilidade das células tumorais da linhagem U87MG, no tempo de 48 horas após o tratamento e uma tendência de efeito dose-dependente pode ser observada para as duas frações. No entanto, a fração obtida por degradação controlada de Smith, GBH-S, foi mais efetiva que a fração purificada GBH no tempo de 48 horas, quando se utilizou a concentrações de 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

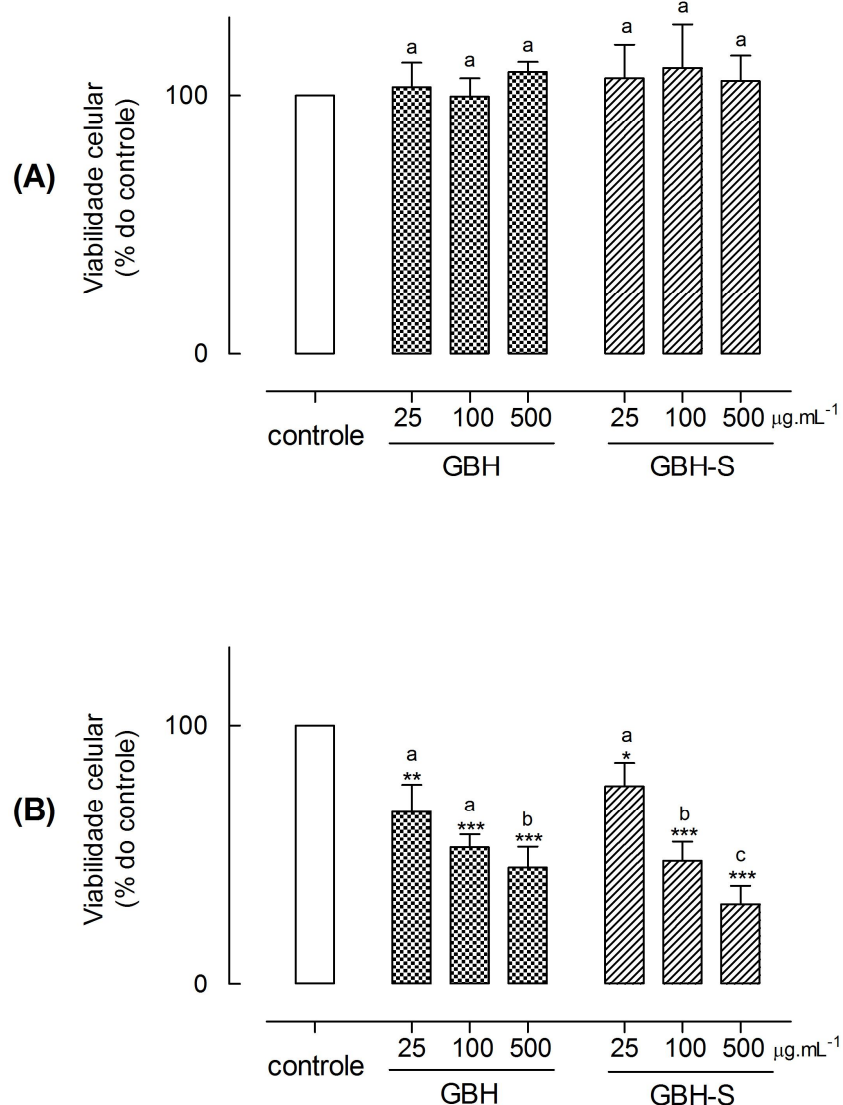


FIGURA 37 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM DE GLIOMA HUMANO U87MG APÓS TRATAMENTO COM POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES GBH E GBH-S.

(A) 24 horas e (B) 48 horas. A condição controle é representada como 100% de viabilidade. Os dados demonstrados são relativos de 4 experimentos independentes realizados em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as concentrações de uma mesma fração individual ($p < 0,01$).

Frações polissacarídicas constituídas de 23% de grupos sulfato obtidas da alga parda *S. pallidum* apresentaram capacidade de redução da viabilidade, de maneira dose-dependente, de células HepG2 de hepatoma humano, A549 de câncer de pulmão humano e de MGC-803 de câncer gástrico no tempo de 48 horas. A inibição foi 62,2%, 64,8% e 79,6% para as células HepG2, A549 e MGC-803, respectivamente, na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (YE *et al.*, 2008).

Nos estudos de atividade antitumoral de Ropelatto (2011) com heteroramnanas sulfatadas obtidas de *G. oxysperma*, utilizando a linhagem celular U87MG, os resultados de diminuição da viabilidade das células tumorais U87MG foram observados no tempo de 24 horas. No entanto, os resultados foram significativos somente na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já no tempo de 48 horas, Ropelatto (2011) verificou que a máxima diminuição da viabilidade celular (65%) foi observada com uma fração polissacarídica bruta na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Dando continuidade aos estudos de Ropelatto (2011), foi observado que após o tratamento das células de glioma com as diferentes frações polissacarídicas, em qualquer concentração, não foi possível verificar através de microscópio óptico indício de células mortas, ou seja, a presença de células soltas. Ao invés disso, foi verificado poços com menor confluência. Isso sugere que talvez as frações polissacarídicas estivessem inibindo a proliferação dessas células tumorais, ao invés de promover sua morte.

Dando continuidade a estes estudos, os mecanismos de ação das heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* e seus produtos de degradação controlada de Smith, foram avaliados por citometria de fluxo (CARVALHO, 2013). Estes polissacarídeos sulfatados ocasionaram um aumento no número de células na fase G1 do ciclo celular, indicando que os mesmos atuam como compostos antitumorais pela parada do ciclo celular. O mecanismo de ação das heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis*, ainda não realizados, poderiam determinar se esta é uma característica das heteroramnanas sulfatadas.

Uma observação sobre a atividade antitumoral de fucanas sulfatadas sobre células tumorais de Sarcoma 180, de melanoma B16 e de carcinoma de pulmão Lewis é que a habilidade antitumoral apresentada por estes polissacarídeos está relacionada à sua capacidade de inibir a angiogênese. O polímero inibiu o desenvolvimento das células tumorais através do bloqueio de VEGF aos seus receptores VEGFRs presentes na membrana celular. Foi verificado também que

quando os polímeros nativos, que já possuíam algum grau de sulfatação, foram totalmente sulfatados através de modificações químicas, ocorreu uma potencialização na atividade antiangiogênica destes polissacarídeos (KOYANAGI *et al.*, 2003).

Desta forma, assim como para os ensaios de vasculogênese e angiogênese deste trabalho, a principal hipótese para ação antitumoral das heteroramnanas sulfatadas obtidas da macroalga verde *G. brasiliensis* seria através do sequestro dos fatores angiogênicos VEGF e FGFb.

9.3. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. brasiliensis*

O potencial anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados obtidos de *G. brasiliensis*, frações GB, GBH e GBH-S foi determinado pelo prolongamento do tempo de coagulação em segundos, através dos ensaios clássicos de coagulação TTPA (Tempo de tromboplastina parcial ativada), TT (Tempo de trombina) e TP (Tempo de protrombina). Estes testes são denominados de testes funcionais, pois monitoram a formação do coágulo de fibrina, sendo indicados como testes *screening* para hemostasia, incluindo sintomas de hemorragia, monitoramento da terapia anticoagulante e, também, como exame de rotina para pré-operatórios (KAMAL; TEFFERI; PRUTHI, 2007).

Para a avaliação das atividades anticoagulantes foram utilizadas a solução salina como controle negativo (valores normais de coagulação), concentrações crescentes da fração nativa GB (0,1, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma, concentração final), da fração purificada GBH (0,1, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma, concentração final) e na fração purificada e dos produtos de degradação controlada de Smith, fração GBH-S (0,1, 1, 5, 10, 20, 40, 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma, concentração final). Heparina obtida da mucosa intestinal de suínos (Sigma-Aldrich) foi empregada como controle positivo nas concentrações crescentes de 0,1, 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma (concentração final).

Os resultados dos ensaios TTPA, TT e TP foram expressos como médias ($n = 3$) \pm DPM e estão listados na Tabela 16.

TABELA 16 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE POR TTPA, TT E PT DAS FRAÇÕES GB, GBH E GBH-S ISOLADAS DE *G. brasiliensis*.

| Fração ^a | Concentração ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) | TTPA (s) ^b | TT (s) ^c | PT (s) ^d |
|---------------------|---|-----------------------|---------------------|---------------------|
| GB | salina | 29,6 ± 1,5 | 13,0 ± 1,0 | 8,3 ± 0,6 |
| | 0,1 | 32,0 ± 5,5 | 14,6 ± 1,1 | 12,3 ± 0,6 |
| | 1 | 28,3 ± 2,3 | 21,3 ± 0,6 | 37,6 ± 1,5 |
| | 5 | 34,6 ± 3,0 | 35,0 ± 1,0 | 46,3 ± 3,8 |
| | 10 | 43,3 ± 4,0 | 47,0 ± 2,0 | 52,6 ± 3,2 |
| | 20 | 68,0 ± 1,7 | 56,6 ± 2,9 | 53,0 ± 3,0 |
| | 40 | 94,0 ± 7,8 | 99,6 ± 2,1 | 74,3 ± 4,0 |
| | 60 | 129,6 ± 8,3 | 113,0 ± 1,0 | 99,0 ± 1,0 |
| | 80 | 173,6 ± 5,8 | >120 | >120 |
| 100 | >200 | >120 | >120 | |
| GBH | salina | 29,6 ± 1,5 | 13,0 ± 1,0 | 8,3 ± 0,6 |
| | 0,1 | 31,0 ± 3,0 | 13,3 ± 0,6 | 13,6 ± 1,5 |
| | 1 | 28,6 ± 0,5 | 23,6 ± 1,5 | 29,3 ± 2,5 |
| | 5 | 36,0 ± 2,6 | 36,0 ± 1,0 | 37,6 ± 0,6 |
| | 10 | 45,6 ± 2,8 | 42,3 ± 0,6 | 44,3 ± 1,5 |
| | 20 | 57,3 ± 2,1 | 55,6 ± 0,6 | 55,6 ± 2,1 |
| | 40 | 89,6 ± 3,0 | 91,6 ± 4,6 | 63,6 ± 3,2 |
| | 60 | 132 ± 7,9 | 105,6 ± 3,8 | 86,6 ± 1,5 |
| | 80 | 168,3 ± 3,5 | >120 | 108 ± 7,2 |
| 100 | >200 | >120 | >120 | |
| GBH-S | salina | 29,6 ± 1,5 | 13,0 ± 1,0 | 8,3 ± 0,6 |
| | 0,1 | 42,3 ± 1,5 | 17,3 ± 1,1 | 13,0 ± 1,0 |
| | 1 | 57,0 ± 3,0 | 38,6 ± 0,6 | 45,0 ± 1,7 |
| | 5 | 85,6 ± 2,0 | 62,0 ± 2,6 | 56,6 ± 2,1 |
| | 10 | 130,6 ± 4,6 | 73,6 ± 4,9 | 87,0 ± 2,6 |
| | 20 | 189,0 ± 4,9 | 97,3 ± 2,1 | 94,6 ± 3,8 |
| | 40 | >200 | >120 | 117,6 ± 2,5 |
| 60 | >200 | >120 | >120 | |
| HP | salina | 29,6 ± 1,5 | 13,0 ± 1,0 | 8,3 ± 0,6 |
| | 0,1 | 55,0 ± 4,0 | 34,3 ± 1,5 | 17,3 ± 1,1 |
| | 1 | 87,3 ± 0,5 | 82,6 ± 3,5 | 65,3 ± 2,1 |
| | 5 | 156,3 ± 8,0 | 106,0 ± 2,0 | 88,0 ± 1,0 |
| | 10 | >200 | >120 | 108,3 ± 2,5 |
| 20 | >200 | >120 | >120 | |

^a GB = fração bruta, GBH = fração purificada, GBH-S = produtos de degradação controlada de Smith e HP = Heparina porcina (controle positivo); ^b TTPA = Tempo de tromboplastina parcial ativada em segundos; ^c TT = Tempo de trombina em segundos; ^d TP = Tempo de protrombina em segundos.

9.3.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

O reagente de TPPA é chamado de tromboplastina parcial ativada, pois o fator tissular não está presente junto com os fosfolipídios (KAMAL; TEFFERI; PRUTHI, 2007). Este ensaio baseia-se na ativação do sistema intrínseco da coagulação e é uma boa técnica para avaliação de problemas com os fatores VIII e IX, além dos fatores de contato. A cefalina de coelho utilizada no ensaio atua como substituto plaquetário e o fator de contato necessário para desencadear a coagulação é o caolin ou sílica. A ativação do fator XI é dependente de cálcio, por isso é necessária a adição do mesmo para ativação da cascata (HAN *et al.*, 2005, MARTINICHEN *et al.*, 2005). Assim, as deficiências ou inibidores dos fatores de coagulação das vias intrínseca e final comum resultam no prolongamento do ensaio de TTPA.

A heparina apresentou atividade anticoagulante para o ensaio de TTPA, sendo que na concentração de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aumentou em 0,8 vezes o tempo de coagulação do plasma e na dose de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ já inibiu completamente a formação do coágulo quando comparado com os valores obtidos para o controle negativo (29,6 s).

Na Figura 38 pode se observar que as frações GB, GBH e GBHS foram capazes de prolongar o tempo de coagulação pelo teste de TTPA de maneira dose-dependente. Os polissacarídeos presentes na fração GBH-S foram potencialmente mais efetivos que os polissacarídeos das frações GB e GBH, na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o tempo de coagulação do plasma foi de 57,0 s para GBH-S, 1,9 vezes maior que o controle negativo (29,6 s). A ação máxima de GBH-S (>200 s) foi atingida na concentração de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A fração purificada GBH foi igualmente efetiva à fração GB nas mesmas concentrações. A fração nativa GB, na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o tempo para coagulação do plasma foi de 43,3 s sendo 1,4 vezes maior que o do grupo controle negativo (29,6 s) e a ação máxima (>200 s) foi atingida com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

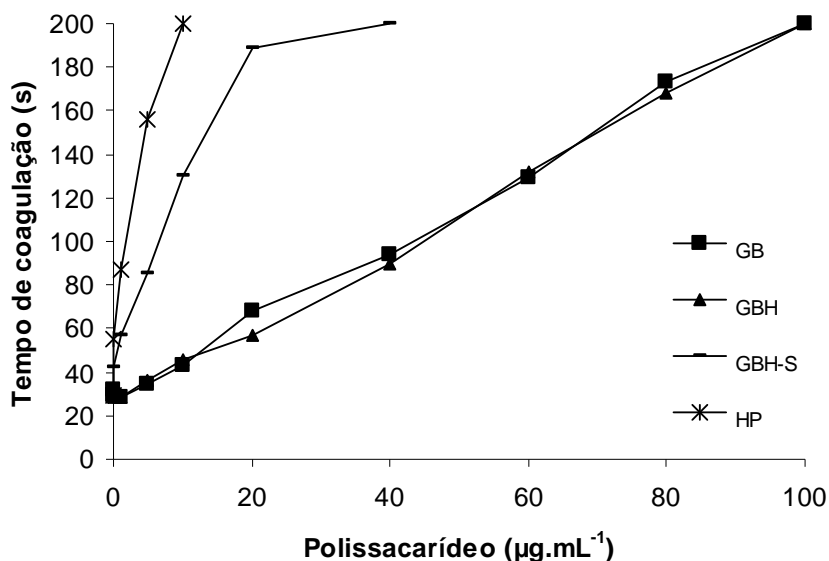


FIGURA 38 – TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (TTPA) PARA AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS GB, GBH E GBHS OBTIDAS DE *G. brasiliensis*.

Plasma humano com valores normais de TTPA foi incubado com diferentes concentrações de polissacarídeos. Valores >200 s foram considerados como ausência de coagulação.

Comparando a ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados presentes nas frações GB, GBH e GBH-S, observa-se uma potência diferente, pois a fração obtida por degradação controlada de Smith, GBH-S, foi mais efetiva que GB e GBH e em baixas concentrações já são capazes de prolongar o TTPA. Estes dados sugerem que os polissacarídeos sulfatados estão interagindo com fatores da via intrínseca da coagulação ou com a via final comum, prolongando o tempo necessário para a coagulação, e que as diferenças estruturais entre eles resultam em respostas diferentes.

9.3.2. Tempo de Trombina (TT)

O teste de Tempo de Trombina é utilizado para avaliar o último passo da cascata de coagulação, a formação de fibrina mediada pela trombina (ALBAN; FRANZ, 2001). Neste ensaio, a heparina inibiu totalmente a coagulação em uma concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As frações GB, GBH e GBH-S foram efetivas e prolongaram o tempo de coagulação do plasma quando este tempo foi avaliado pelo teste de TT (FIGURA 39).

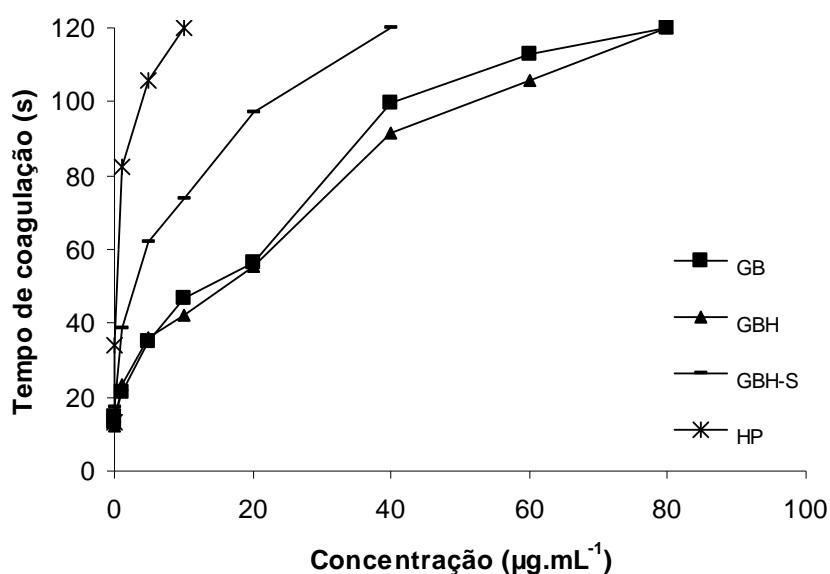


FIGURA 39 – TEMPO DE TROMBINA (TT) PARA AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS GB, GBH E GBHS OBTIDAS DE *G. brasiliensis*.

Plasma humano com valores normais de TT foi incubado com diferentes concentrações de polissacarídeos. Valores >120 s foram considerados como ausência de coagulação.

Quando se utilizou os polissacarídeos das frações GB e GBH na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o tempo de coagulação foi de 21,3 e 23,6 s, sendo 1,6 e

1,8 vezes maior em relação ao tempo de coagulação do controle negativo (13,0 s) respectivamente. A atividade máxima atingida foi na concentração de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma para ambas as frações, GB e GBH, com valores de coagulação > 120 s.

Como observado para o teste de TTPA, a fração GBH-S foi mais efetiva e na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o tempo de coagulação foi de 38,6 s sendo 2,9 vezes maior em relação ao controle negativo (13,0 s). Na concentração de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a fração GBH-S a atividade máxima foi atingida, com valores > 120 s.

9.3.3. Tempo de Protrombina (TP)

O teste de Tempo de Protrombina é utilizado para avaliar a via extrínseca da cascata de coagulação. Neste teste, a heparina prolongou o TP em 17,3 s, sendo 2 vezes maior em relação ao controle negativo (8,3 s) e inibiu totalmente a coagulação na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A atividade anticoagulante avaliada por TP das frações GB, GBH e GBHS está demonstrada na Figura 40. Todas as frações testadas foram efetivas e prolongaram o tempo de coagulação avaliado pelo teste de TP em diferentes concentrações. A fração GBH-S prolongou potencialmente o TP, no entanto, uma concentração maior, $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dos polissacarídeos desta fração foi necessária para inibir totalmente a coagulação em relação aos testes de TTPA e TT, $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A fração GB inibiu totalmente a coagulação quando se utilizou uma concentração de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que para a fração GBH, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram necessários para se ter a mesma atividade.

A fração GBHS contém maiores teores de sulfato (38,2%), maior concentração de unidades de ramnose (74,5 mol%) e polissacarídicos de massa molar menor. Estes fatores podem estar potencializando a atividade anticoagulante dessa fração, em relação às frações GB e GBH, como observado nos três ensaios anticoagulantes testados (TTPA, TT e PT).

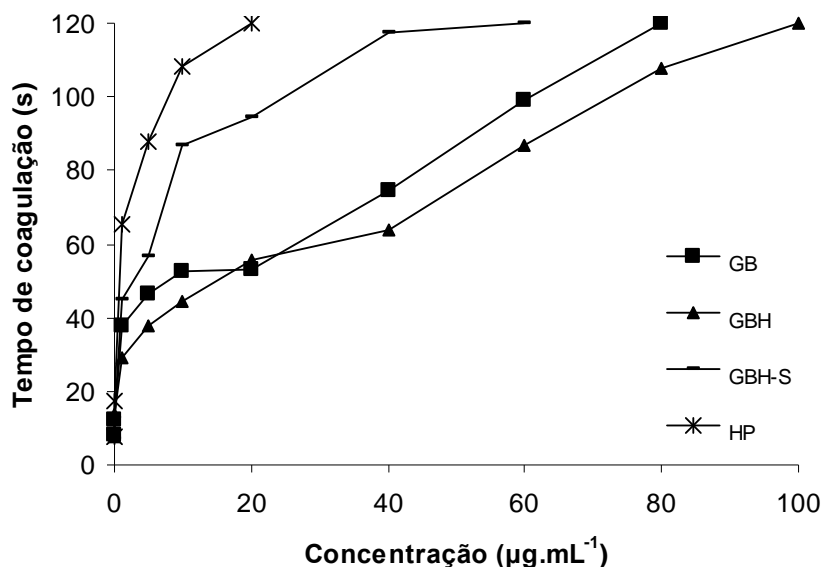


FIGURA 40 – TEMPO DE PROTROMBINA (TP) PARA AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS GB, GBH E GBHS OBTIDAS DE *G. brasiliensis*.

Plasma humano com valores normais de TP foi incubado com diferentes concentrações de polissacarídeos. Valores >120 s foram considerados como ausência de coagulação.

A prolongação do TTPA indica a inibição do sistema intrínseco e/ou da via final comum da coagulação, a prolongação de TT baseia-se na inibição da atividade da trombina ou da polimerização da fibrina e a prolongação de TP demonstra a inibição da via extrínseca da cascata de coagulação. Portanto, os resultados de atividade anticoagulante das frações GB, GBH e GBH-S, obtidos de *G. brasiliensis*, demonstram que esses polissacarídeos sulfatados são capazes de atuar no sistema intrínseco e/ou na via final comum e no sistema extrínseco da cascata de coagulação.

Nos experimentos de TTPA, TT e TP desse trabalho, a heparina apresentou uma ação anticoagulante muito alta, pois em baixas concentrações já inibiu completamente a coagulação do plasma. Estes resultados reforçam o grande risco de sangramento que a heparina pode causar, uma vez que o seu intervalo de segurança é muito pequeno.

A atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados obtidos de diversas espécies de macroalgas verdes marinhas é descrita por vários pesquisadores (MAO

et al., 2008; ZHANG *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; QI *et al.*, 2012). A complexidade das estruturas desses polissacarídeos, como por exemplo, a massa molar, o teor de sulfato, os monossacarídeos constituintes e o padrão de ligação entre essas unidades monossacarídicas são as principais características no estudo da atividade anticoagulante desses polímeros (PEREIRA; MELO; MOURÃO 2002). No entanto, a relação exata entre, a atividade anticoagulante e a estrutura química dessas moléculas, ainda não está esclarecida.

Mao e colaboradores (2008) estudaram a atividade anticoagulante através dos testes de TTPA e TT de uma fração purificada (870 kDa), constituída principalmente por ramnose (79,4%) e contendo 28,2% de sulfato, obtidas da macroalga verde *Monostroma nitidum*. Essa fração prolongou o TTPA e inibiu totalmente a formação do coágulo em uma concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com valores de coagulação > 200 s. Uma concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi necessária para inibir de forma total a coagulação quando se utilizou o teste de TT com valores de coagulação > 120 s. Mais recentemente, os mesmos pesquisadores demonstraram que ramnanas sulfatadas (massa molar de 55 kDa, 86,7 % de ramnose e 23,5 % de sulfato) obtidas de outra espécie de macroalga verde marinha, *Monostroma latissimum*, foram mais efetivas, em relação aos polissacarídeos obtidos de *M. nitidum*, quanto a atividade anticoagulante, nas mesmas condições experimentais. No teste de TTPA, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e no teste de TT, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos polissacarídeos inibiram totalmente a formação do coágulo (MAO *et al.*, 2009). Para esse último estudo, os polissacarídeos não foram efetivos na via extrínseca da cascata de coagulação pelo teste de TP.

Modificações químicas realizadas nos polissacarídeos nativos podem auxiliar no estudo da relação entre, a estrutura química e a atividade anticoagulante desses polímeros. Fragmentos polissacarídicos de massas molares diferentes (10,6-725,4 kDa), obtidos por oxidação com periodato a partir de um polissacarídeo nativo, extraído de *M. latissimum*, foram estudados quanto à atividade anticoagulante por Zhang e colaboradores (2008). Os fragmentos que continham maiores massas molares, entre 61,9-725,4 kDa, foram mais efetivos quanto à atividade anticoagulante, quando comparados aos fragmentos de menor massa molar (10,6-26,0 kDa).

A relação entre a estrutura química e a atividade anticoagulante, é descrita em detalhes para homopolissacarídeos como, galactanas e fucanas sulfatadas

obtidas de organismos marinhos (COLLIEC *et al.*, 1991; PEREIRA; MELO; MOURÃO 1999; HAYAKAWA *et al.*, 2000). O padrão de interação heparina-antitrombina pode não se estender para outros polissacarídeos sulfatados. Cada tipo de polissacarídeo pode formar um complexo particular com o inibidor do plasma e a protease alvo. Os requerimentos estruturais para a interação de polissacarídeos sulfatados com inibidores da coagulação e suas proteases alvo não são apenas uma consequência da sua densidade de carga. A base para essa interação é complexa, pois envolve polissacarídeos naturalmente heterogêneos e assim, um profundo conhecimento das características químicas desses polissacarídeos sulfatados é um pré-requisito para a compreensão da sua atividade anticoagulante (ZHANG *et al.*, 2008).

9.4. ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS POLISSACARÍDEOS DA FRAÇÃO GB OBTIDA DE *G. brasiliensis* SOBRE O HSV-1 E O HSV-2

Os vírus herpes simplex tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) podem causar infecções primárias e recidivantes, e as lesões herpéticas produzidas por estes vírus são consideradas um problema de saúde mundial. De modo geral, a maioria das infecções orais é causada pelo HSV-1 e as infecções genitais pelo HSV-2 (WIGG; MIRANDA, 2008). O uso de antivirais tanto a nível tópico como sistêmico já tem sido amplamente discutido sobre sua eficácia, enfatizando a importância do uso do aciclovir e de seus efeitos reduzidos de toxicidade (De CLERCK, 2004). No entanto, tem-se observado o aparecimento de estirpes resistentes a esse antiviral. Deste modo, a busca por outras opções de tratamento deve ser considerada (FERREIRA; MARTINS; ROMANOS, 2009).

Neste contexto, destaca-se a potente atividade antiviral apresentada por muitos polissacarídeos sulfatados obtidos de fontes naturais contra vírus envelopados, ex.: vírus da imunodeficiência humana (HIV), herpes simplex vírus (HSV) e citomegalovírus humano (DAMONTE; MATULEWICZ; CEREZO, 2004; DUARTE *et al.*, 2004; CASSOLATO *et al.*, 2008; TALARICO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2012).

Vírus herpes simplex infectam as células do hospedeiro através da interação entre a glicoproteína C do envelope viral e o heparan sulfato (presente na superfície das células). O complexo formado (vírus-célula) ocorre através de interações entre grupos aniônicos (principalmente sulfato) no polissacarídeo e aminoácidos básicos da glicoproteína viral, e também por grupos não iônicos, dependendo da hidrofobicidade dos aminoácidos intercalados entre os grupos básicos da zona de ligação da glicoproteína (DAMONTE; MATULEWICZ; CERZO, 2004).

O efeito inibitório dos polissacarídeos sulfatados é descrito destacando à sua habilidade em interferir na etapa inicial da interação do vírus com a célula hospedeira, e conseqüentemente, ao bloqueio da entrada viral na célula. Esta habilidade de interferir na interação vírus-célula ocorre devido à grande densidade de cargas negativas presentes nestes polímeros polissulfatados, tornando possível a interação com os domínios da glicoproteína viral, que são carregados positivamente. Outro mecanismo tem sido proposto, onde que além da proteção das cargas positivas da glicoproteína viral, os compostos polissulfatados promovem um potencial negativo adicional, capaz de interromper o contato inicial vírus-célula (CALLAHAN *et al.*, 1991).

Tendo em vista a importância dos polissacarídeos sulfatados como potenciais agentes antivirais, a fração polissacarídica bruta (GB) obtida da macroalga verde *G. brasiliensis* foi submetida a testes de atividade antiviral contra o HSV-1 e o HSV-2. Para a realização destes testes foi utilizada a cultura de células Vero (fibroblasto de rim de macaco africano) e as amostras de vírus herpes simplex tipos 1 e 2 isoladas a partir do fluido de vesículas características de herpes labial e de lesões da genitália, respectivamente. Estas amostras de vírus pertencem à coleção do LEDAC (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas/IMPPG/UFRJ).

Para avaliar da atividade antiviral das heterorramnanas sulfatadas produzidas pela alga *G. brasiliensis*, inicialmente foi realizado o ensaio de citotoxicidade. Este ensaio é baseado na mudança de morfologia celular e na captação do corante vermelho neutro. A partir desse teste pode-se observar que os polissacarídeos da fração GB não apresentaram efeito sobre a viabilidade das células Vero. Esse resultado é semelhante ao obtido por outros estudos que avaliam a atividade antiviral de polissacarídeos de algas verdes (CASSOLATO *et al.*, 2008; VO *et al.*, 2011).

Avaliando a atividade antiviral de polissacarídeos obtidos de 10 espécies de algas verdes pertencentes a diferentes ordens, Lee e colaboradores (2004) não observaram toxicidade desses polímeros sobre células Vero, mesmo em

concentrações acima de $900 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ademais, em estudos com uma espécie do gênero *Gayralia*, particularmente a espécie *G. oxysperma*, Cassolato e colaboradores (2008) verificaram que heteroramnanas sulfatadas obtidas dessa alga não apresentaram toxicidade sobre células Vero.

Os polissacarídeos sulfatados presentes na fração GB exibiram potente atividade antiherpética *in vitro*, sendo mais efetivos contra o HSV-2 do que para o HSV-1. Na Tabela 17 verifica-se que a fração GB demonstrou baixo efeito inibitório no crescimento das células Vero, com valores de CC_{50} superiores a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A fração GB exibiu potente atividade antiherpética com valor de CI_{50} de $1,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o HSV-1 e com valor 1,5 vezes menor ($0,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para o HSV-2. Esses resultados demonstram que os polissacarídeos sulfatados presentes na fração GB foram capazes de inibir a multiplicação desses dois tipos vírus. Ademais, a fração GB apresentou altos índices de seletividade ($IS = CC_{50}/CI_{50}$), com valores na ordem de $>166,6$ para HSV-1 e 1,5 vezes maior para ($> 256,4$) para o HSV-2, demonstrando a especificidade do efeito inibitório desses polímeros contra o vírus herpes simplex.

TABELA 17 – CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DA FRAÇÃO BRUTA GB OBTIDA DE *G. brasiliensis*.

| $CC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})^a$ | $CI_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})^b$ | | IS ^c | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------|--------|
| >200 | HSV-1 | HSV-2 | HSV-1 | HSV-2 |
| | 1,2 | 0,78 | >166,6 | >256,4 |

HSV-1 = vírus *Herpes simplex* tipo 1; HSV-2 = vírus *Herpes simplex* tipo 2; ^a CC_{50} (concentração citotóxica 50%): concentração necessária para reduzir em 50% do número de células Vero viáveis; ^b CI_{50} (concentração inibitória 50%): concentração necessária para reduzir em 50% a replicação viral em células Vero; ^c IS índice de seletividade = CC_{50}/CI_{50}

A Figura 41 apresenta os resultados do mecanismo de ação dos polissacarídeos da fração GB obtida de *G. brasiliensis* sobre a infecção pelo HSV-1 e pelo HSV-2 às células Vero. Pode-se verificar que a fração GB apresentou atividade virucida com uma percentagem de inibição de 26% para HSV-1 e um valor elevado de 97% para o HSV-2. Além disso, o pré-tratamento das células com a fração GB mostrou uma alta percentagem de inibição de 78% e 95% para HSV-1 e HSV-2, respectivamente. No ensaio de penetração, 76% de inibição foram observados para HSV-1 e 78% para HSV-2.

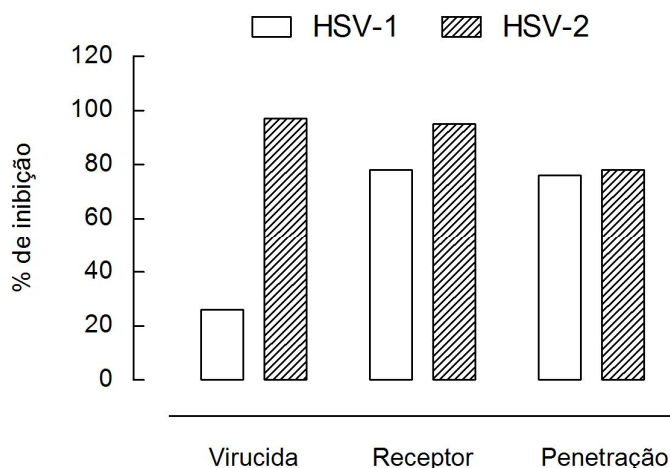


FIGURA 41 – MECANISMO DE AÇÃO ANTIVIRAL DA FRAÇÃO GB OBTIDA DE *G. brasiliensis* MEDIANTE AO HSV-1 E AO HSV-2.

Atividade Virucida: partículas dos vírus foram tratadas com a fração GB, onde a amostra foi incubada a 37 °C por 2 horas, diluída, e inoculada em monocanadas de células Vero. **Atividade sobre o Receptor:** a fração GB foi adicionada às células Vero no período de 1 hora e removida antes da infecção. **Atividade de Penetração:** a fração GB foi adicionada às células Vero após a adsorção e então as células foram incubadas durante 1 hora e, em seguida, a fração foi removida.

Polímeros sulfatados obtidos de diferentes gêneros de macroalgas e microalgas verdes, como *Enteromorpha*, *Chaetomorpha*, *Monostroma*, *Caulerpa*, *Codium* e *Gayralia* (GHOSH *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; CASSOLATO *et al.*, 2008; VO *et al.*, 2011), exibem atividade antiherpética. Polissacarídeos sulfatados isolados de uma espécie de macroalga verde, *Monostroma latissimum*, apresentaram potente atividade inibitória contra diferentes tipos de vírus envelopados, a exemplo do citomegalovírus humano, que apresentou IS = 2180, do HIV-1 (IS = 1740) e do vírus herpes simplex tipo 1 (IS = 8100). Estes polissacarídeos também inibiram a adsorção do vírus à célula hospedeira e interferiram nas etapas posteriores da replicação viral (LEE *et al.*, 1999).

A atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados tem sido frequentemente correlacionada com a massa molar e o grau de sulfatação. Como regra geral, é suposto que a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados é maior quando se

aumenta o peso molar e o grau de sulfatação destes polímeros (WITVROUW; De CLERCQ, 1997). Polissacarídeos com baixa massa molar e baixos teores de grupos sulfato, não desempenham atividade antiviral. No entanto, outros fatores como, por exemplo: conformação da cadeia polissacarídica, influência de sítios hidrofóbicos e posicionamento dos grupos sulfato são também importantes para o desempenho de atividade biológica produzida por estes polissacarídeos (DAMONTE; MATULEWICZ; CERZO, 2004).

A alta atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2 descrita para as heteroramnanas sulfatadas da alga verde *G. oxysperma* foi correlacionada com uma combinação de fatores estruturais, como a alta massa molar e o elevado conteúdo de grupos sulfato, onde 75% e 80% das unidades de ramnose e de ácido urônico, respectivamente, são substituídos por grupos sulfato (CASSOLATO *et al.*, 2008). Aliado a essas características o caráter hidrofóbico do grupo metil das unidades de ramnose é um fator adicional que poderia contribuir para a atividade antiherpética desses polissacarídeos (CASSOLATO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010).

Para as heteroramnanas de *G. brasiliensis* possivelmente as características estruturais de alto grau de sulfatação, massa molar, composição monossacarídica estejam envolvidos na capacidade antiviral destas moléculas. No entanto, mais estudos sobre o mecanismo de ação destes polímeros sobre capacidade de infecção da célula pelo vírus precisam ser realizados.

10. CONCLUSÕES

CAPITULO I

- A macroalga verde *Gayralia brasiliensis* pertencente à ordem Ulvales (Chlorophyta) produz heteroramnanas sulfatadas (29,4% de grupos sulfato), contendo majoritariamente unidades de α -L-ramnose (64,0%) e menores proporções de glucose (14,5%), xilose (14,7%) e galactose (6,7%). Adicionalmente, este polissacarídeo é constituído por ácidos urônicos (9,1%) sendo ácidos glucurônico e galacturônico na proporção de 3,2% e 3,7%, respectivamente.

- Através de ultrafiltração em membrana (*cut-off* 300 kDa) obteve-se uma fração retida (GBH, 72% de rendimento) que se mostrou homogênea quanto a massa molar (2.100 kDa).

- Através de análises químicas e espectroscópicas conduzidas com a heteroramnana sulfatada GBH foram detectadas unidades de ramnose 3-ligadas as quais estão parcialmente substituídas por grupos sulfato em C-4, C-2 e/ou em ambos carbonos C-2 e C-4 e unidades de ramnose 4-, 3- e/ou dissulfatadas (3,4 sulfato). Adicionalmente, unidades de ramnose 2,3-substituídas que representam pontos de ramificação do polímero e ácidos urônicos, estão presentes principalmente como unidades 2-, 4- e 2,4-ligadas também foram encontrados nesta fração.

- Pela integração dos sinais α anoméricos da fração GBH (carboxi-reduzida e dessulfatada), presentes no espectro de RMN ^1H foi possível determinar a relação das unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, 3- e 2-ligadas, na proporção de 0,26:1,0:0,51, respectivamente.

- Através da degradação controlada de Smith a partir de GBH foi possível obter uma heteroramnana modificada quimicamente (GBH-S) de menor massa molar e com elevados teores de grupos sulfato (38,2%) e ramnose (78,2%).

CAPITULO II

- As heteroramnanas sulfatadas presentes nas frações GB, GBH e GBH-S apresentaram potente atividade antivasculogênica na membrana da vesícula vitelínica de embriões de *G. domesticus* sendo a heteroramnana modificada GBHS a que apresentou maior atividade. Na concentração de 320 µg GBHS ocasionou 100% de inibição da vascularização enquanto que GB e GBH nesta mesma concentração inibiram a vascularização em 94,2 e 86,9%, respectivamente. As frações GB e GBH-S também inibiram a formação de vasos da membrana corioalantóica destes embriões em 100% nas concentrações de 480 e 320 µg.

- Estas heteroramnanas apresentaram atividade antitumoral significativa em células tumorais de glioma humano, onde as frações GBH e GBH-S (500 µg.mL⁻¹) diminuíram significativamente a viabilidade das células tumorais cerebrais (glioma humano, linhagem U87MG) no tempo de 48 horas em 54,9% e 69%, respectivamente.

- Além disso, as heteroramnanas de *G. brasiliensis*, apresentaram atividade anticoagulante, avaliada *in vitro* pelos testes de TTPA, TT e TP. A ação máxima (>200 s) das frações GB, GBH e GBH-S para o teste de TTPA foi observada nas concentrações de 100, 100 e 40 µg.mL⁻¹, respectivamente. Para o teste de TT esta ação foi detectada nas concentrações de 80, 80, 40 µg.mL⁻¹ para as frações GB, GBH e GBH-S, respectivamente. Adicionalmente, GB (100 µg.mL⁻¹), GBH (80 µg.mL⁻¹) e GBH-S (60 µg.mL⁻¹) também apresentaram atividade máxima anticoagulante pelo teste de TP.

- A fração GB foi potencialmente ativa contra o HSV-1 e o HSV-2, onde se observou baixo efeito inibitório no crescimento das células Vero, com valores de CC₅₀ superiores que > 200 µg.mL⁻¹. A atividade anti-herpética foi determinada com valores de CI₅₀ igual a 1,2 µg.mL⁻¹ para o HSV-1 e 0,78 µg.mL⁻¹ para o HSV-2. Ademais, as heteroramnanas apresentaram altos índices de seletividade (IS = CC₅₀/CI₅₀), com valores na ordem de >166,6 para HSV-1 e > 256,4 para o HSV-2.

- Adicionalmente, os polissacarídeos da fração GB apresentaram atividade virucida com inibição de 26% para HSV-1 e de 97% para o HSV-2. Além disso, esta fração apresentou ação sobre a ligação do vírus a célula (78% e 95% de inibição para HSV-1 e HSV-2, respectivamente) e no ensaio de penetração, 76% para HSV-1 e 78% para HSV-2 de inibição, respectivamente.

- A fração modificada (GBH-S) obtida por degradação controlada de Smith foi significativamente mais eficiente que as frações brutas (GB e GBH) nos testes de atividade biológica. Portanto, este tipo de modificação química é importante não só para os estudos de estrutura química de polissacarídeos, mas também para os estudos de atividade biológica destes polímeros.

- Devido à capacidade de atuar em diferentes sistemas biológicos, as heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis* se mostram como novas moléculas promissoras na área biomédica.

REFERÊNCIAS

ABTA – American Brain Tumor Association. Disponível em: <http://www.abta.org/Tumor_&_Treatment_Info/Gliomas/230>. Acesso em 10/09/2010.

Angiogenesis, microenvironment and therapeutic response: chorioallantoic membrane mode <<http://www.fondation-ritc.net/-Microenvironnement-tumoral-.html?lang=en>>. Acesso em 04/05/2013.

ADHIKARI, U. MATEU, C.G.; CHATTOPADHYAY, K.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2474-2482, 2006.

ADINI, A.; FAINARU, O.; UDAGAWA, T.; CONNOR, K.M.; FOLKMAN, J.; D'AMATO, R.J. Matrigel cytometry: A novel method for quantifying angiogenesis *in vivo*. **J. Immun. Meth.**, v. 342, p. 78-81, 2009.

AGOCHA, A.; LEE, H.W.; EGHBALI-WEBB, M. Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblasts: effects of transforming growth factor-beta1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 29, n. 8, p. 2233-44, 1997.

AISA, Y.; MIYAKAWA, Y.; NAKAZATO, T.; SHIBATA, H.; SAITO, K.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Fucoidan Induces Apoptosis of Human HS-Sultan Cells Accompanied by Activation of Caspase-3 and Down-Regulation of ERK Pathways. **American Journal of Hematology**, v. 78, p. 7–14, 2005.

ALBAN, S.; FRANZ, G. Partial synthetic glucan sulfates as potential new antithrombotics: a review. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 354-361, 2001.

APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K.; JULIANO, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 197-263, 1998.

AQUINO, R.S; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R.; MOURÃO, P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v.15, p.11–20, 2005.

AREY, L.B. **Developmental Anatomy: A textbook and laboratory manual of embryology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1974

ATHUKORALA, Y.; AHN, G.N.; JEE, Y-H.; KIM, G-Y.; KIM, S-H; HA, J-H.; KANG, J-S.; LEE, K-W.; JEON, Y-J. Antiproliferative activity of sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Ecklonia cava* on the U-937 cell line. **J Appl Phycol**, v. 21, p. 307–314, 2009.

AYBAR, M.J.; MAYOR, R. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 12, n. 4, p. 452-458, 2002.

BACKINOWSKY, L.V.; BALAN, M.F.; SHASHKOV, A.S.; KOCHETKOV, N.K. Synthesis and ¹³C-N.M.R. spectra of β-L-rhamnopyranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 84, p. 225-235, 1980.

BeMILLER, J.N. Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 22, p. 25-108, 1967.

BERGERS, G. & BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer.**, v. 3, p. 401-410, 2003.

BERGERS, G.; HANAHAN, D.; COUSSENS, L.M. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 42, p. 995-1002, 1998.

BERTI, F.V. **Efeito da aloína e do extrato do parênquima clorofiliano da *Aloe barbadensis* na viabilidade de células tumorais e na formação de vasos sanguíneos.** Florianópolis 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos.

BYRD, N.; GRABEL, L. Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. **Trends in Cardiovascular Medicine.** v. 14, n. 8, p. 308-313, 2004.

BLINDING, C. A critical survey of European taxa in Ulvales: part II – *Ulva*, *Ulvaria*, *Monostroma*, *Kornmannia*. **Bot. Notiser.** v. 121, p. 535-629, 1968.

BOCK, K.; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 42, p. 193-225, 1990.

BOREFREUND, E.; PUERNER, J. Toxicity determined by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, pp. 119-124, 1985.

BOUIS, D.; KUSUMANTO, Y.; MEIJER, C.; MULDER, N.H.; HOSPERS, G.A. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. **Pharmacol. Res.**, v.53, p.89-103, 2006.

BUPP BECKER, S.R.; SHIBLEY JR, I.R. Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. **Alcohol Alcohol**, v. 33, n. 5, p. 457-464, 1998.

BÜRGERMEISTER, J.; PAPER, D.H.; VOGL, H.; LINHARDT, R.J. e FRANZ, G. LaPSvS1, a (1→3(-β-galactan sulfate and its effect on angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. **Carb. Res.**, v. 337, p. 1459-1466, 2002.

CALLAHAN, L.; PHELAN, M.; MALLISON, M., NORCROSS, M. Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD₄ interactions. **J. Virol.**, v. 65, p. 1543-1550, 1991.

CAMELINI, C.M.; MENDONÇA, M.M.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. β -glucanas do cogumelo *Agaricus subrufescens* Peck (sinonímia *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinemann = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 35, p. 36-47, 2006.

CAMPESTRINI, L.H. ***Aloe barbadensis* Miller: Análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (FP) e da acemanana**. Florianópolis 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UFSC.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in câncer and other diseases. **Nature**, v. 407, p. 249-257, 2000.

CARVALHO, L.R. de; ROQUE, N.F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química nova**, v. 23, n. 6, 2000.

CARVALHO, M.M. de. **Heterorramnanas sulfatadas obtidas de *Gayralia oxysperma*: Investigação do mecanismo de atividade antitumoral e caracterização química dos produtos de degradação parcial**. Curitiba 2013. Tese (Mestrado em Ciências Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

CÁSSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.

CASSOLATO, J.E.F.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; PELIZZARI, F.M.; DAMONTE, E.B. e DUARTE, M.E.R. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 3085-3095, 2008.

CHEN, R.H.; CHEN, W.Y. Rheological properties of the water-soluble mucilage of a green laver, *Monostroma nitidum*. **J. Appl. Phycol.**, v. 13, p. 481-488, 2001.

CHEN, H.; YAN, X.; LIN, J.; WANG, F. e XU, W. Depolymerized products of λ -carragenan as a potent angiogenesis inhibitor. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 6910-6917, 2007.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COLLIEC, S.; FISCHER, A.M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thromb. Res.**, v. 64, p. 143–154, 1991.

COFFEY Jr, R.J.; LEOF, E.B.; SHIPLEY, G.D.; MOSES, H.L. Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 132, p. 143-148, 1987.

CORNELIUS, L.A.; NEHRING, L.C.; ROBY, J.D.; PARKS, W.C.; WELGUS, H.G. Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 105, p. 170-176, 1995.

CORRÊA, J.B.C. **Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos**. v. 62, 1971.

CORNELIUS, L.; NEHRING, L. ROBY, J.; PARKS, W.; WELGUS, H. Microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors migration. **J. Invest. Dermatol.** v. 105, p. 170-176, 1995.

COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; CORDEIRO, S.L.; OLIVEIRA, R.M.; SABRY, D.A.; CÂMARA, R.B.G.; NOBRE, L.T.D.B.; COSTA, M.S.S.P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E.H.C.; LEITE, E.L. & ROCHA, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomed. & Pharmacother.**, v. 64, p. 21-28, 2010.

CUMASHI, A.; USHAKOVA, N.A.; PREOBRAZHENSKAYA, M.E.; D'INCECCO, A.; PICCOLI, A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G.E.; BERMAN, A.E.; BILAN, M.I.; USOV, A.I.; USTYUZHANINA, N.E.; GRACHEV, A.A.; SANDERSON, C.J.; KELLY, M.; RABINOVICH, G.A.; IACOBELLI, S. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**. v. 17, p. 541-552, 2007.

D'AMORE, P.A.; THOMPSON, R.W. Mechanisms of angiogenesis. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 49, p. 453-64, 1996.

DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Sulfated seaweed polyaccharides as antiviral agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2399-2419, 2004.

DE CLERCK, E. Antiviral drugs in current clinical use. **J. Clin. Virol.**, v. 30, p. 115-133, 2004.

DEMUTH, T.; BERENS, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion, **Journal of Neuro-Oncology**, v. 70, p. 217-228, 2004.

DHOOT, G.K.; GUSTAFSSON, M.K.; A.I, X.; SUN, W.; STANDIFORD, D.M. e EMERSON JR, C.P. Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. **Science**, v. 293, n. 5535, p.1663-1666, 2001.

DIAS, P.F.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; MARASCHIM, R.P.; MARASCHIM, M. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento.**, nº 25, 2002.

DIAS, P.F.; SIQUEIRA Jr, J.M.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A.G.; GAGLIARDI, A.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvascular Research.**, v. 75, p. 34-44, 2008.

DIAS, P.F.; SIQUEIRA Jr, J.M.; VENDRUSCOLO, L.F.; NEIVA, T.J.N.; GAGLIARDI, A.R.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer. Chemother. Pharmacol.**, v. 56, p. 436-446, 2005.

DODGSON, K.S.; PRICE, R.G. A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. **Biochem. J.**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DORDUNOO, S.K.; JACKSON, J.K.; ARSENAULT, L.A.; OKTABA, A.M.; HUNTER, W.L. e BURT, H.M. Taxol encapsulation in poly(epsilon-caprolactone) microspheres. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 36, n. 4, p. 279-82, 1995.

DRAKE, C.J.; LaRUE, A.; FERRARA, N.; LITTLE, C. VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. **Developmental Biology**. v. 224, p. 178-188, 2000.

DREYFUSS, J.L.; REGATIERI, C.V.; JARROUGE, T.R.; CAVALHEIRO, L.P.; SAMPAIO, L.O.; NADER, H.B.; Heparan Sulphate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 81, n. 3, p. 409-429, 2009.

DUARTE, M.E.R.; CARDOSO, M.A.; NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 281-293, 2001a.

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; CARDOSO, M.A.; TULIO, S.; CEREZO, A.S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1137-1144, 2002.

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; GONÇALVES, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. & CEREZO, A.S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Pol.**, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 8, n.1, p. 53-58, 2001b.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EYAL-GILADI, H. The early embryonic development of the chick, as an epigenetic process. **Critical. Rev. Poultry. Biol.**, v. 3, p. 143-166, 1991.

FACHINGER, G.; DEUTSCH, U; RISAU, W. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the Angiopoietin receptor Tie-2. **Oncogene**, v. 18, p. 5948-5953, 1999.

FERREIRA, L.G. **Estrutura química e atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do complexo laurencia (Ceramiales, Rhodophyta)**. Curitiba 2011. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

FERREIRA, L.G.; NOSEDA, M.D.; GONÇALVES, A.G.; DUCATTI, D.R.B.; FUJII, M.T.; DUARTE, M.E.R. Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 347, n° 1, p. 83-94, 2012.

FERREIRA, D. de C.; MARTINS, F.O.; ROMANOS, M.T.V. Impacto do laser de baixa intensidade na supressão de infecções pelos vírus *Herpes simplex 1* e *2*: estudo *in vitro*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 82-85, 2009.

FEYZI, E.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; LINDAHL, U.; SPILLMANN, D. Structural requirement of heparin sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 24850-24857, 1997.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FOLKMAN, J. Angiogenesis-dependent diseases. **Seminars in Oncology**, v. 28, p. 536-542, 2001.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, p. 442-447, 1987.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. **J. Med.**, v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 313, p.355-64, 1992.

FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, T.T. The xilogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 615-620, 1990.

GAGLIARDI, A.R.; HADD, H.E.; COLLINS, D.C. Inhibition of angiogenesis by suramin. **Cancer Res.**, v. 52, p. 5073-5075, 1992.

GAGLIARDI, A.R.; COLLINS, D.C. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. **Cancer Research.**, v. 53, p. 533-535, 1993.

GALE, N.W.; YANCOPOULOS, G.D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and Ephrins in vascular development. **Genes Dev.** v. 13, p. 1055–1066, 1999.

GALLAGHER, J.T. Heparan sulphates as membrane receptors for the fibroblast growth factor. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 32, p. 239-247, 1994.

GAYRAL, P. *Monostroma* Thuret, *Ulvaria* Rupr. Emend. Gayral, *Ulvopsis* Gayral (Chlorophycées, Ulotrichales) structure, reproduction, cycles, position systématique. **Rev. Gen. Bot.** v. 62, p. 627-338, 1965.

GERBER, P.; DUTCHER, J.; ADAMS, E.; SHERMAN, J. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza virus B or mumps virus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 99, p. 590-593, 1958.

GILBERT, M.M.; SMITH, J.; ROSKAMS, A.J. e AUD, V.J. Neuroligin 3 is expressed in a wide range of glia during development. **Developmental Biology**, v. 222, p. 256-256, 2000.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B. e RAY, B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3151-3157, 2004.

GOLDSTEIN, I. J.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). **Methods Carbohydr. Chem. Academic Press**, New York, v. 5, p. 361-369, 1965.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J. Morphol.**, v. 88, p. 49-92, 1951.

HAN, F.; YAO, W.; YANG, X.; LIU, X.; GAO, X. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 36 (4), p. 201-207, 2005.

HANAHAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patters and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell.**, v. 86, p. 353-364, 1996.

HARADA, N.; MAEDA, M. Chemical structure of antithrombin-active rhamnan sulfate from *Monostroma nitidum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, p. 1647-1652, 1998.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J-B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **A. Biochim. Biophys.**, v. 1543, p. 86-94, 2000.

HE, Z-H.; HE, M-F.; MA, S-C.; BUT, P.P-H. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives. **J. Ethnopharm.**, v. 121, p. 313-317, 2009.

HENDRIX, M.J.; SEFTOR, E.A.; HESS, A.R.; SEFTOR, R.E. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: Lessons from melanoma. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 3, p. 411-421, 2003.

HENDRIX, A.; GESPACH, C.; BRACKE, M.; DE WEVER, O. The tumor ecosystem regulates the roads for invasion and metastasis. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 35, p. 714-719, 2011.

HEROLD, B.C.; GERBER, S.I.; POLONSKY, T.; BELVAL, B.J.; SHAKLEE, P.N.; HOLME, K. Identification of structural features of heparin required for inhibition of herpes simplex virus type 1 binding. **Virology**, v. 206, p. 1108-1116, 1995.

HORWITZ, A. F. Integrins and health. **Sci. Am.**, v.276, p. 68-75, 1997.

HOUILLON, C. Tolerance of ovarian grafts between the various species of urodele Amphibia: effects on the emission of heterologous eggs. **C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.**, v. 274, n. 20, p. 2790-2793, 1972.

HUHEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S.M. Activity of *Porphyridium sp.* polysaccharide against herpes simplex viruses *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 50, p. 189-200, 2002.

IMAMURA, T.; MITSUI, Y. Heparan Sulfate and Heparin as a Potentiator or a Suppressor of Growth of Normal and Transformed Vascular Endothelial Cells. **Experimental Cell Research**, v. 172, p. 92-100, 1987.

INGBER, D.; FUJITA, T.; KISHIMOTO, S.; SUDO, K.; KANAMARU, T.; BREM, H.; FOLKMAN, J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. **Nature**, v. 348, p. 555-557, 1990.

IRUELA-ARISPE, M.L.; LANE, T.F.; REDMOND, D.; REILLY, M.; BOLENDER, R.P.; KAVANAGH, T.J.; SAGE, E.H. Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis *in vivo*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 6, n. 3, p. 327-343, 1995.

ITO, K.; HORI, K. Seaweed: chemical composition and potential food uses. **Food Reviews International**, v. 05, p. 101-144, 1989.

JACKSON, C.J.; GILES, L.; KNOP, A.; NETHERY, A.; SCHRIEBER, L. Sulfated polysaccharides are required for collagen-induced vascular tube formation. **Exp. Cell. Res.**, v. 215, p. 294-302, 1994.

JAKOB, W.; JENTZSCH, K.D.; MAUERSBERGER, B.; HEDER, G. Chick-embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors – Reactions induced by carrier materials. **Experimentelle Phatologie**, v. 15, p. 241-249, 1978.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDBERG, B.; JÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**, v. 8, p. 1-71, 1976.

JANSSON, P.E.; KENNE, L.; WIDMALM, G. Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ^1H - and ^{13}C -N.M.R. data. **Carbohydr. Res.**, v. 188, p. 169-191, 1989.

JONES, N.K.; ILJIN, K.; DUMENT, D.J.; ALITALO, K. Tie receptors: New modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 257-267, 2001.

JUNG, W.K.; LE, J.Y.; KIM, S.K. A novel anticoagulant protein from *Scapharca broughtonii*. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 35, p. 199-205, 2001.

KAMAL, A. H.; TEFFERI, A.; PRUTHI, R. K. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. **Mayo Clin. Proc.**, v. 82(7), p. 864-873, 2007.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annu. Rev. Biochem.** v. 60, p. 443-475, 1991.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNIREL, Y.A.; OVOD, V.V.; ZDOROVENKO, G.M.; GVOZDYAK, R.I.; KROHN, K.J. Structural of the O-polysaccharide and immunochemical relationships between the lipopolysaccharides of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato and pathovar maculicola. **Eur. J. Biochem.**, v. 258, p. 657-661, 1998a.

KNIREL, Y.A.; OVOD, V.V.; PARAMONOV, N.A.; KROHN, K.J. Structural heterogeneity in the O-polysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. coriandricola GSPB 2028 (NCPB 3780, W-43). **Eur. J. Biochem.**, v. 258, p. 716-721, 1998b.

KOCH, A.E. Angiogenesis – Implications for rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, p. 951-962, 1998.

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 173-179, 2003.

LAHAYE, M.; AXELOS, M.A.V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.). **Carbohydr. Polym.**, v. 22, p. 261-265, 1993.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green algae *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydrate Research**, v. 283, p. 161-173, 1996.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 304, p. 325-333, 1997.

LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUROUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. **Carbohydr. Polym.**, v. 36, p 239-249, 1998.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. **Circ Res.** v. 100, p. 782-794, 2007.

LEE, J.B.; KOIZUMI, S.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T. Structure of rhamnan sulfate from the green alga *Monostroma nitidum* and its anti-herpetic effect. **Carbohydr. Polym.** v. 81, p. 572-577, 2010.

LEE, J.-B.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. **Planta Medica**, v. 70, p. 813-817, 2004.

LEE, J.B.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; SANKAWA, U.; MAEDA, M. Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. **Planta Medica**, v. 65, p. 439-441, 1999.

LEE, J.B.; YAMAGAKI, T.; MAEDA, M. & NAKANISHI, H. Rhamnan sulfate from cell walls of *Monostroma latissimum*. **Phytochemistry.**, v. 48, p. 921-925, 1998.

LELIAERT, F.; SMITH, D.R.; MOREAU, H.; HERRON, M.D.; VERBRUGGEN, H.; DELWICHE, C.F.; CLERCK, O. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. **Crit. Rev. Plant. Sci.** v. 31, p. 1-46, 2012.

LEVITAN, I.B.; KACZMAREK, L.K. Form e function in cells of the brain. In: **The Neuron.** 3 ed. New York: Oxford University Press, 2002, p. 25-46.

LEWIS, L.A.; McCOURT, R.M. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1535-1556, 2004.

LI, H.; MAO, W.; HOU, Y.; GAO, Y.; QI, X.; ZHAO, C.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; LI, N.; WANG, C. Preparation, structure and anticoagulant activity of a low molecular weight fraction produced by mild acid hydrolysis of sulfated rhamnan from *Monostroma latissimum*. **Bioresource Technology.**, v. 114, p. 414-418, 2012.

LIPKIND, G.M.; SHASHKOV, A.S.; KNIREL, Y.A.; VINOGRADOV, E.V.; KOCHETKOV, N.K. A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of ¹³C-N.M.R. data. **Carbohydr. Res.**, v. 175, p. 59-75, 1988.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: Origins of the theory. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 2, n. 7, p. 545-50, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAEDA, M.; UEHARA, T.; HARADA, N.; SEKIGUCHI, M.; HIRAOKA, A. Heparinoid-active sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the Chlorophyta. **Phytochemistry.**, v. 30, p. 3611-3614, 1991.

MAO, W.; LI, H.; LI, Y.; ZHANG, H.; QI, X.; SUN, H.; CHEN, Y.; GUO, S. Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **International Journal of Biological Macromolecules.**, v. 44, p. 70-74, 2009.

MAO, W.-J.; FANG, F.; LI, H.-Y.; QI, X.-H.; SUN, H.-H.; CHEN, Y.; GUO, S.-D. Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*. **Carbohydr. Pol.** v. 74, p. 834-839, 2008.

MAO, W.; ZHANG, X.; LI, Y.; ZHANG, H. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. **Journal of Applied Phycology.**, v.18, p. 9-14, 2006.

MARKOULATOS, P.; GEORGOPOULOU, A.; SIAFAKAS, N.; PLAKOKEFALOS, E.; TZANAKAKI, G.; KOUREA-KREMASTINO, J. Laboratory diagnosis of common herpes virus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p. 4426–4432, 2001.

MARTINICHEN, J.C. **Propriedades anticoagulantes e antitrombóticas de polissacarídeos quimicamente sulfatados.** Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MATOU, S.; HELLY, D.; CHABUT, D.; BROS, A.; FISCHER, A.M. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis *in vitro*. **Thromb. Res.**, v. 106, p. 213-221, 2002.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules.**, v. 28, p. 395-399, 2001.

MCCORMICK, J.F.; J. NASSAUER; J. BIELUNAS; J. LEIGHTON. Anatomy of the Chick Chorioallantoic Membrane Relevant to Its Use as a Substrate in Bioassay Systems. **Scanning Electron Microscopy.** v. 4, p. 2023-2030, 1984.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival - Application to Proliferation and Cyto-Toxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63. 1983.

MOURÃO, P. A. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. **Curr Pharm Design.** v. 10, p. 967-981, 2004.

MOURÃO, P.A.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends Cardiovasc Med.** v. 9. p. 225-232, 1999.

MOURÃO, P.A. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 5-17, 2007.

MOURÃO, P.A.; PEREIRA, M.S.; PAVÃO, M.S.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D.M.; MOWINCKEL, M.S.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 23973-23984, 1996.

MOURY, J.D.; SCHOENWOLF, G.C. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis, and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. **Dev.**, v. 204, n. 3, p. 323-37, 1995.

MUNDHENKE, C.; MEYER, K.; DREW, S.; FRIEDL, A. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. **Am. J. Pathol.**, v. 60, p. 185-194, 2002.

NADER, H.B.; LOPES, C.C.; ROCHA, H.A.; SANTOS, E.A.; DIETRICH, C.P. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Curr. Pharm. Des.**, v. 10, p. 951-966, 2008.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.**, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NASATTO, P.L. **Polissacarídeos de macroalgas verdes com potencial aplicação biotecnológica: caracterização química e análises reológicas**. Curitiba 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná.

NGUYEN, M.;Y. SHING, J.; FOLKMAN. Quantitation of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick-Embryo Chorioallantoic Membrane. **Microvascular Research**, v. 47, n. 1, p. 31-40. 1994.

NISHIMURA, T.; TOKU, K.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenil substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. **Kitasato Arch. Exp. Med.**, v. 50, p. 39-46, 1977.

NODA, H.; AMANO, H.; ARASHIMA, K.; NISIZAWA, K. Antitumor activity of marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 577-584, 1990.

OLIVEIRA, E.C.; HORTA, P.A.; AMÂNCIO, C.E.; SANT'ANNA, C.L. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. 1999. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/brnd/round6/guias/PERFURACAO/PERFURACAO_R6/refere/plantas_marinhas.pdf> Acesso em 07/01/13.

OHTA, Y.; LEE, J.B.; HAYASHI, K. e HAYASHI, T. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v. 32, n. 5, p. 892-898, 2009.

OPPENHEIM, R.W.; LEVIN, H.L.; HARTH, M.S. An investigation of various egg-opening techniques for use in avian behavioral embryology. **Dev Psychobiol.**, v. 6, n. 1, p. 53-68, 1973.

ORTIZ, J.; ROMERO, N.; ROBERT, P.; ARAYA, J.; LOPEZ-HERNÁNDEZ, J.; BOZZO, C.; NAVARRETE, E.; OSORIO, A.; RIOS, A. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chem.**, v. 99, p. 98-104, 2006.

OVOD, V.V.; ZDOROVENKO, E.L.; SHASHKOV, A.S.; KOCHAROVA, N.A.; KNIREL, Y.A. Structural diversity of O-polysaccharide and serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* and other strains of genomospecies 4. **Microbiology**, v. 73, p. 666-677, 2004.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**. New York: **Academic Press**. p.195-285, 1983.

PANDYA, N.M.; DHALLA, N.S.; SANTANI, D.D. Angiogenesis – a new target for future therapy. **Vascular Pharmacology**. v. 44, p. 265-274, 2006.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; PIZZOFERRATO, L.; LIQUORI, A.M. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 309-315, 1999.

PARK, H.Y.; LIM, C.W.; KIM, Y.K.; YOON, H.D.; LEE, K.J. Immunostimulating and anticancer activities of hot water extract from *Capsosiphon fulvescens*. **J Korean Soc Appl Biol Chem.**, v. 49, p. 343–348, 2006.

PATTEN, B.M. **Early Embryology of the Chick**. 4° ed. McGraw-Hill, New York, 1951.

PELLIZZARI, F.M.; ABSHER, T.; YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Cultivation of the edible green seaweed *Gayralia* (Chlorophyta) in southern Brazil. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 63-69, 2007.

PELLIZZARI, F.M.; ABSHER, T.; YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from southern Brazil. **J. Appl. Phycol.**, v. 20, p. 75-82, 2008.

PELLIZZARI, F.M.; OLIVEIRA, E.C.; YOKOYA, N. S. Coverage and recruitment of the edible green macroalga *Monostroma oxyspermum* in Paranaguá Bay in southeastern Brazil. **J. Coast. Res.**, v. 39 (special issue), 2004.

PELLIZZARI, F.; OLIVEIRA, M.C.; MEDEIROS, A.S.; YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Morphology, ontogeny, and phylogenetic position of *Gayralia brasiliensis* sp. nov. (Ulotrichales, Chlorophyta) from the southern coast of Brazil. *Botanica Marina*, v. 10, 2013.

PEREIRA, M.S.; MELO, F.R.; MOURÃO, P.A.S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? **Glicobiology**, v. 12, p. 573-580, 2002.

PESENTI, E.; SOL, F.; MONGELLI, N.; GRANDI, M.; SPREAFICO, F. Suramin prevents neovascularization and tumor growth through blocking of basic fibroblast growth factor activity. **Br. J. Cancer.**, v. 66, p. 367-374, 1992.

POMIM, V. H. Fucanomics and galactonomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1820, p. 1971-1979, 2012.

PRINCIVALLE, M.; DE AGOSTINI, A. Developmental roles of heparan sulfate proteoglycans: A comparative review in *Drosophila*, mouse and human. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 46, n. 3, p.267-278, 2002.

QI, X.; MAO, W.; GAO, Y.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; ZHAO, C.; LI, N.; WANG, C; YAN, M.; LIN, C.; SHAN, J. Chemical characteristic of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide from *Enteromorpha clathrata*. **Carbohydr. Res.** v. 90, p. 1804-1810, 2012.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. **Carbohydr. Res.**, v. 274, p. 251-261, 1995a.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. **Carbohydr. Res.**, v. 274, p. 313-318, 1995b.

RAY, B. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: isolation, purification and structural features. **Carbohydr. Polym.**, v. 66, p. 408-416, 2006.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; NICO, B.; RONCALI, L.; CAMMACCO, F. Postnatal vasculogenesis. **Mechanisms of Development**. v. 100, p. 157-163, 2001.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-674, 1997.

RISAU, W.; SARIOLA, H.; ZERWES, H.G.; SASSE, J.; EKBLUM, P.; KEMLER, R.; DOETSCHMAN, T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. **Development**, v. 102, p. 471-478, 1988.

RODRIGUES, J.A.G.; TORRES, V.M.; ALENCAR, D.B. DE; SAMPAIO, A.H.; FARIAS, W.R.L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, p. 224-231, 2009.

ROPELATTO, J. **Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de degradação parcial obtidos da macroalga verde *Gayralia oxysperma***. Curitiba 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards from GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SANTOS, M.G.M.; LAGROTA, M.H.C.; MIRANDA, M.M.F.S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; WIGG, M.D. A screening for the antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. **Bot. Mar.**, v. 42, p. 227-230, 1999.

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 317-333. 2006.

SCHOENWOLF, G.C. Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses. **Ciba. Found. Symp.**, v. 181, p. 25-38, 1994.

SENCHEKOVA, S.N.; SHASHKOV, A.S.; LAUX, P.; KNIREL, Y.A.; RUDOLPH, K. The O-chain polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. *Begoniae* GSPB 525 is a partially L-xilosylated L-rhamnan. **Carbohydr. Res.**, v. 319, p. 148-153, 1999.

SEOW, L. J.; BEH, H-K.; MAJID, A.M.S.A.; MURUGAIYAH, V.; ISMAIL, N.; ASMAWI, M.Z. Anti-angiogenic activity of *Gynura segetum* leaf extracts and its fractions. **J. Ethnopharm.**, v. 134, p. 221-227, 2011.

SILVA, F.R.F.; DORE, C.M.P.G.; MARQUES, C.T.; NASCIMENTO, M.S.; BENEVIDES, N.M.B.; ROCHA, H.A.O.; CHAVANTE, S.F.; LEITE, E.L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26-33, 2010.

SPRINGER, M.L.; CHEN, A.S.; KRAFT, P.E.; BEDNARSKI, M.; BLAU, H.M. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. **Molecular Cell**, v. 2, p. 549-558, 1998.

SHANMUGAM, M; MODY, K.H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Current science**, v. 79, 2000.

SHIBLEY JR, I.A.; PENNINGTON, N.S. Sodium ion-dependent (N-methylamino)-alpha-isobutyric [correction of iso butyric] acid uptake by embryonic chick cells exposed to ethanol in ovo: response to the stimulation/downregulation of protein kinases. **Alcohol**, v. 33, n. 5, p. 451-6, 1998.

SHIBUYA, M.; CLAESSEON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 549-560, 2006.

SOEDA, S.; SAKAGUCHI, S.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. **Biochem. Pharmacol.**, v. 43, p. 1853-8, 1992.

SOEDA, S.; SHIBATA, Y.; SHIMENO, H. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular endothelial cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 20, p. 1131-5, 1997.

SOEDA, S.; KOSAKO, T.; IWATA, K.; SHIMENO, H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1497, p. 127-134, 2000.

SNEDDON, H.; HADDEN, R.; HEPPEL, P.G. Chemosensory learning in the chicken embryo. **Physiol. Behav.**, v. 64, n. 2, p. 133-139, 1998.

STEVAN, F.R.; OLIVEIRA, M.B.M.; BUCCHI, D.F.; NOSEDA, M.D.; IACOMINI, M.; DUARTE, M.E.R. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 33, p. 477-484, 2001.

STEVENSON, T.T.; FURNEAUX, R.H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydrate Research**, v. 210, p. 277-298, 1991.

SWEENEY, M.; BEDDY, D.; HONNER, V.; SINNOT, B.; O'REGAN, R.G.; MCLOUGHLIN, P. Effects of changes in pH and CO₂ on pulmonary arterial wall tension are not endothelium dependent. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, p. 2040-2046, 1998.

TALARICO, L.B.; NOSEDA, M.D.; DUCATTI, D.R.B.; DUARTE, M.E.R.; DAMONTE, E.B. Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. **J. Gen. Virol.**, v. 92, p. 1332-1342, 2011.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuranans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxil groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

TOBELEM, G. Tumor angiogenesis. **M.S-Medicine Sciences**, v. 6, p. 426-432, 1990.

VALDES-DAPENA, M.A.; AREY, J.B. The diagnosis of malignant neoplasms in infants and children. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 4, n. 3, p. 164-173, 1974.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, v. 27, p. 139-145, 2004.

VINOGRADOVA, K.L. Sistematike poryadka Ulvales (Chlorophyta). **Bot. Z.** v. 54. p. 1347-1355, 1969.

VO, S-T.; NGO, D-H.; TA, Q.V.; KIM, S-K. Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 44, p. 10-20, 2011.

VU, M.T.; SMITH, C.F.; BURGER, P.C.; KLINTWORTH G.K. Methods in Laboratory Investigation - an Evaluation of Methods to Quantitate the Chick Chorioallantoic Membrane Assay in Angiogenesis. **Laboratory Investigation**, v. 53, n. 4, p. 499-508. 1985.

WAGENER, C.; ERGUN, S. Angiogenic properties of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1. **Exp. Cell. Res.**, v. 261, p. 19-24, 2000.

WALKER, W.E.; WAISBREN, B.A.; MARTINS, R.R.; BATAYIAS, G.E. A method for determining sensitivities of antiviral drugs in vitro for possible use as clinical consultation. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 56, p. 687-692, 1971.

WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S. Víroses Dermotrópicas. **Introdução à Virologia Humana.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 177-211, 2008.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr. Pol.**, v. 4, p. 14-21, 2011.

WITVROUW, M.; De CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **General Pharmacology**, v. 29, p. 497-511, 1997.

WUDUNN, D.; SPEAR, P.G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate, **J. Virol.**, v. 63, p. 52-58, 1989.

YANCOPOULOS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W.; RUDGE, J.S.; WIEGAND, S.J. e HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, p. 242-8. 2000.

YAMAMOTO, M.; TADOKORO, Y.; IMAI, H.; MITA, K. Physicochemical characterization of sulfated polysaccharides from green seaweeds: *Ulva pertusa* and *Ulva conglobata*. **Agric. Biol. Chem.** v. 44, p. 723-729, 1980.

YAYON, A.; KLABSBRUM, M. Autocrine transformation by chimeric signal peptide-basic fibroblast growth factor: reversal by suramin. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.**, v. 87, p. 367-374, 1990.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chemistry**, v. 111, p. 428-432, 2008.

YUANA, H.; SONGA, J.; LI, X.; LI, N.; DAI, J. Immunomodulation and antitumor activity of k-carrageenan oligosaccharides. **Cancer Letters**, v. 243, p. 228–234, 2006.

ZAMMARETTIA, P.; ZISCH, A.H. Adult 'endothelial progenitor cells' renewing vasculature. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 493-503, 2005.

ZDOROVENKO, E.L.; OVOD, V.V.; SHASHKOV, A.S.; KOCHAROVA, N.A.; KNIREL, Y.A.; KROHN, K. Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae* ICMP 8047.

ZHANG, H.-J.; MAO, W.-J.; FANG, F.; LI, H.-Y.; SUN, H.-H.; CHEN, Y.; QUI, X.-H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 71, p. 428-434, 2008.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. *In vivo* antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 47–53, 2004.

ZUBIA, M.; FABRE, M.S.; KERJEAN, V.; LANN, K.L.; STIGER-POUVREAU, V.; FAUCHON, M.; DESLANDES, E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chemistry**, v. 116, p. 693–701, 2009.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MÜNSTEDT, K.; LANG, U.; LIANG, O.D. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 110, p. 10-18, 2003.