

SIUMARA TULIO

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS ISOLADOS DE *Bostrychia*  
*montagnei* (RHODOPHYTA, CERAMIALES)**

Dissertação apresentada ao colegiado do  
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica  
da Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial para a obtenção do título  
de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA  
1998

SIUMARA TULIO

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS ISOLADOS DE *BOSTRYCHIA*  
*MONTAGNEI* (RHODOPOHYTA, CERAMIALES)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
no curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná,  
pela comissão formada pelos professores:

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia R. Duarte  
Departamento de Bioquímica, UFPR

Profa. Dra. Maria Benigna M. de Oliveira  
Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof. Dr. Marcello Iacomini  
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 24 de Junho de 1998.

**Orientadora**  
**Profa. Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte**

**Co-orientador**  
**Prof. Dr. Miguel Daniel Noseda**

É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glória, mesmo expondo-se à derrota, do que, formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito e nem sofrem muito, porque vivem nesta penumbra cinzenta, que não conhecem nem vitória, nem derrota.

Theodoro Roosevelt

**Aos meus pais, Vilma e Tilio, com carinho.**

## **AGRADECIMENTOS**

**À Profa. Dra. Maria Eugênia R. Duarte, pela orientação necessária para a realização deste trabalho.**

**Ao Prof. Dr. Miguel D. Noseda, pelos auxílios prestados.**

**À Dra. Elza Damonte e ao Dr. Carlos Pujol, pela orientação e auxílio na padronização dos ensaios de atividade antiviral.**

**À Prof.a. Dra. Madalena Shirata, PUC-PR, pela coleta e classificação taxonômica da alga.**

**À família Noseda, pelo carinho e a hospitalidade durante a estada em Buenos Aires.**

**Aos meus pais, Vilma e Túlio, pelos ensinamentos.**

**Aos meus avós e minha tia Vânia, pelo apoio e estímulo em todos os momentos.**

**À Profa. Shirley Watanabe, pela sugestão de realizar o mestrado em Bioquímica, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.**

**À Bioquímica Lismara Bonfim, pela amizade e colaboração para a realização dos testes de atividade anticoagulante.**

Aos amigos Dr. Paulo Tadeu e Dr. Reginaldo Lopes, pela confiança, estímulo, ajuda incondicional e por tudo que me ensinaram.

Ao Ricardo, pelo companheirismo, carinho e compreensão.

À Profa. Dra. Maria Rita Sierakowisk, pelas correções e sugestões que muito me ajudaram.

Ao Prof. Aguinaldo Nascimento pelo auxílio na determinação dos testes para análise estatística.

À coordenação e aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica.

Às amigos Joaine, Fabiane, Cirene, Míriam, Cíntia e Marcelo, pelas palavras de apoio, carinho e os agradáveis momentos de convivência.

Aos amigos companheiros de laboratório, Samira, Daniel, Adriano, Marco, Priscila, Fabíola e Gladis, pela ajuda incondicional e por tornarem o dia-a-dia muito agradável.

Ao César, Renato e Tânia pelo auxílio nas análises cromatográficas.

À todos que trabalham com Química de Carboidratos, pela colaboração e disposição para ajudar.

Às bibliotecárias Telma, Izabella, Ruth e Mariza, pela atenção e cooperação dispensadas.

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

Ao PRONEX-CARBOIDRATOS.

À Deus que me concedeu saúde e proteção.

Muito Obrigada.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xviii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>  1.1 Polissacarídeos da Parede Celular das Algas Vermelhas.....</b>	<b>2</b>
<b>    1.1 Galactanas de Rodophytas.....</b>	<b>4</b>
<b>      1.2.1 Estrutura Geral.....</b>	<b>4</b>
<b>      1.2.2 Galactanas Tipo Carragenana.....</b>	<b>6</b>
<b>      1.2.3 Galactanas Tipo Ágar.....</b>	<b>9</b>
<b>    1.3 Atividade Antiviral.....</b>	<b>18</b>
<b>      1.3.1 Herpesvírus.....</b>	<b>21</b>
<b>      1.3.2 Replicação viral.....</b>	<b>23</b>
<b>    1.4 <i>Bostrychia montagnei</i>: Polióis e Taxonomia.....</b>	<b>26</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>  3.1 Coleta da Alga.....</b>	<b>31</b>
<b>  3.2 Tratamento com Solventes Orgânicos.....</b>	<b>31</b>
<b>  3.3 Extração dos Polissacarídeos Solúveis em Água.....</b>	<b>31</b>

<b>3.4 Métodos Analíticos Gerais.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5 Métodos Cromatográficos.....</b>	<b>34</b>
3.5.1 Cromatografia de Gel Permeação.....	34
3.5.2 Cromatografia de Troca Iônica.....	35
3.5.3 Cromatografia Líquido-Gasosa (C.G.) .....	35
3.5.4 Cromatografia Líquido-Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (C.G.E.M.).....	35
3.5.5 Métodos Espectroscópicos.....	36
3.5.5.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13.....	36
<b>3.6 Hidrólise Ácida Total do Tipo Hidrólise Redutiva .....</b>	<b>37</b>
<b>3.7 Metilação do Polissacarídeo na Forma de Sal de Trietilamônio.....</b>	<b>37</b>
<b>3.8 Tratamento Alcalino.....</b>	<b>38</b>
<b>3.9 Análise de Atividade Biológica.....</b>	<b>39</b>
<b>3.9.1 Análise da Atividade Antiviral.....</b>	<b>39</b>
3.9.1.2 Cultura de Células Vero.....	39
3.9.1.3 Vírus herpes simplex.....	40
3.9.1.4 Ensaio de Toxicidade.....	40
3.9.1.5 Ensaio de Atividade Antiviral.....	41
<b>3.9.2 Ensaio de Atividade Anticoagulante.....</b>	<b>42</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>
<b>7 LISTA DE PUBLICAÇÕES.....</b>	<b>100</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Esquema 1: Extração dos polissacarídeos de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	45
Figura 1: Unidade A e B- galactana tipo ágar.....	5
Figura 2: Unidade A e B- galactana tipo carragenana.....	5
Figura 3: Vírus herpes simplex.....	22
Figura 4: Replicação do vírus herpes simplex.....	25
Figura 5: Alga <i>Bostrychia montagnei</i> .....	27
Figura 6: Espectro de ressonância magnética nuclear de C-13 das frações B-CW e B-CWE de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	51
Figura 7: Espectro de ressonância magnética nuclear de C-13 das frações B-CHW e B-HWE de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	52
Figura 8: Cromatografia em Sepharose-4B da fração B-CW de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	53
Figura 9: Cromatografia em Sepharose-4B das frações B-1,25, B-1,5, B-4,0 e B-NaOH de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	56
Figura 10: Reação de ciclização: transformação das unidades de galactose 6-sulfato em 3,6-anidrogalactose, em meio alcalino.....	62
Figura 11: Espectro de ressonância magnética nuclear de C-13 da galactana ( <i>kappa</i> -carragenana) isolada da Rhodophyta <i>Hypnea musciformis</i> .....	70
Figura 12: Espectro de ressonância magnética nuclear de C-13 da galactana (porfirana) isolada da Rhodophyta <i>Porphyra columbina</i> .....	71

Figura 13: Espectro de ressonância magnética nuclear de C-13 da galactana B-1,25 isolada da Rhodophyta <i>Bostrychia montagnei</i> .....	73
Figura 14: Espectro de ressonância magnética nuclear de C-13 da galactana B-1,5 isolada da Rhodophyta <i>Bostrychia montagnei</i> .....	74
Figura 15: Espectro de ressonância magnética nuclear de C-13 da região anomérica da galactana B-1,25 isolada da Rhodophyta de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	75
Figura 16: Atividade anti-HSV-1(F) das galactanas B-1,25 e B-1,5 isoladas de <i>B. montagnei</i> .....	86
Figura 17: Atividade anti-HSV-2 (G) das galactanas B-1,25 e B-1,5 isoladas <i>B. montagnei</i> .....	87
Figura 18: Atividade das frações B-Cw, B-HW e B-1,5 isoladas de <i>B. montagnei</i> sobre a replicação do HSV-2 (G).....	88

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Análise das frações polissacarídicas obtidas de <i>B. montagnei</i> .....	47
Tabela 2: Composição em monossacarídeos das frações polissacarídicas obtidas de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	48
Tabela 3: Rendimento e análise dos polisacarídeos obtidos por cromatografia de troca iônica da fração B-CW de <i>B. montagnei</i> .....	57
Tabela 4: Composição dos polissacarídeos obtidos de <i>B. montagnei</i> .....	58
Tabela 5: Análise das frações de polissacarídeos obtidas por cromatografia de troca iônica a partir do extrato purificado de B-CW de <i>B. montagnei</i> .....	59
Tabela 6: Composição em monossacarídeos das frações B-1,25 e B-1,5 antes e após tratamento alcalino.....	63
Tabela 7: Resultados das análises de metilação pelo método de CIUCANU & KEREK das frações B-1,25 e B-1,5 de <i>B. montagnei</i> .....	66
Tabela 8: Deslocamento químico dos sinais dos carbonos anoméricos e primários no espectro de R.M.N.- <sup>13</sup> C das frações B-1,25 e B-1,5 de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	72
Tabela 9: Atividade anticoagulante das frações <i>B. montagnei</i> analisada através do teste TT.....	80
Tabela 10: Atividade anticoagulante das frações de <i>B. montagnei</i> analisada através do teste APTT.....	80
Tabela 11: Atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados de <i>Bostrychia montagnei</i> .....	81

<b>Tabela 12: Efeito da fração B-1,5 sobre a cinética de adsorção do HSV-2</b>	
<b>às células Vero.....</b>	<b>83</b>
<b>Tabela 13: Atividade das frações de <i>Bostrychia montagnei</i> sobre a replicação</b>	
<b>do HSV-1.....</b>	<b>83</b>
<b>Tabela 14: Atividade das frações B-CW, B-HW e B-1,5 de <i>Bostrychia montagnei</i></b>	
<b>sobre replicação do HSV-2(G).....</b>	<b>84</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

APTT- tempo parcial de tromboplastina ativada

B-água- fração obtida por cromatografia de troca iônica, eluída com água

B-CW- fração extraída com água a 25°C

B-CWE- sobrenadante etanólico da extração aquosa a 25°C

B-HW- fração extraída com água a 85°C

B-HWE- sobrenadante etanólico da extração aquosa a 85°C

B-MeOH- sobrenadante metanólico

B-0,75- fração obtida por cromatografia de troca iônica, eluída com NaCl 0,75M

B-1,0- fração obtida por cromatografia de troca iônica, eluída com NaCl 1,0M

B-1,25- fração obtida por cromatografia de troca iônica, eluída com NaCl 1,25M

B-1,5- fração obtida por cromatografia de troca iônica, eluída com NaCl 1,5M

B-4,0- fração obtida por cromatografia de troca iônica, eluída com NaCl 4,0M

B-NaOH- fração obtida por cromatografia de troca iônica, eluída com NaOH 0,5M

B-uréia- fração obtida por cromatografia de troca iônica, eluída com ureia 6M

C.G.- cromatografia gasosa

C.G-E.M.- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

CI<sub>50</sub>- concentração inibitória 50

CC<sub>50</sub>- concentração citotóxica 50

DEPT- distortiones enhancement by polarization transfer

d.i.- dimensão interna

D<sub>2</sub>O- óxido deuterado

DMSO- dimetil sulfóxido

DNA- ácido desoxiribonucleico

GP- grau de polimerização

gB, gC- glicoproteínas dos herpesvírus

HIV- vírus da imunodeficiência humana

HSV- virus herpes simplex

IFI- imunofluorescência indireta

ICD<sub>3</sub>- iodometano deuterado

MTT- sal de tetrazolium (azul de tiazolil)

m/e- unidade de massa

MEM- meio mínimo essencial

NaDH<sub>4</sub>- Borohidreto de sódio deuterado

ppm- partes por milhão

R.M.N.-<sup>13</sup>C- ressonância magnética nuclear de carbono 13

RNA- ácido ribonucleico

rpm- rotação por minuto

SBF- soro bovino fetal

TT- tempo de trombina

TFA- ácido trifluoroacético

UFP- unidade formadora de placa

UI- unidades internacionais

VHS- proteína do herpesvírus

VERO- células de rim de macaco africano

VP- polipeptídeo viral

**3,6-AnGal- 3,6-anidrogalactose**

**2-Me-3,6-AG- 2-O-metil-3,6-anidrogalactose**

**6-MeG- 6-O-metilgalactose**

**2-MeG- 2-O-metilgalactose**

**$\alpha_D$ - rotação ótica específica**

**$\alpha$ -TIF- fator de indução-trans do gene  $\alpha$**

## ABSTRACT

*Bostrychia montagnei* was submitted to aqueous extraction at 25°C and 85°C. The purified polysaccharide extracts represent ~17% of dry alga, galactose is being the principal monosaccharide component of these extracts (64.8-73.7 mols%). 3,6-Anhydrogalactose and its 2-O-methyl derivative were also present in smaller amounts (13.3-18.5 mols%), as well as other methylated sugars, namely 6-O- (6.4-7.9 mols%) and 2-O-methylgalactose (0.2-2.2 mols%). Xylose (3.6-7.3 mols%) and glucose (1.0-2.8 mols%) were also detected. The aqueous extracted polysaccharides (25°C) were separated by anion-exchange chromatography into six sulfated galactan fractions with negative specific rotations. A combination of linkage (methylation) and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic analyses showed that the galactans B-1.25 and B-1.5 were composed of an agar-type backbone of alternating 3-linked  $\beta$ -D- and 4-linked  $\alpha$ -L-galactopyranosyl units. The D-residues in B-1.25 and B-1.5 were partially sulfated on O-6 (27 and 43%) and O-4 (29 e 25%) and methylated on O-6 (8 and 12%, respectively). About 36%, B-1.25, and 26%, B-1.5, of the L-residues are present as the 3,6-anhydride and 28%, B-1.25, and 37%, B-1.5, as L-galactosyl 3-sulfate. The galactan sulfate B-1.5 showed a dose-dependent inhibition of replication of the herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2) in Vero cells, with 50% effective doses in the range of 5.5-6.2  $\mu$ g/ml, respectively, without affecting cell viability at concentrations up of 1000  $\mu$ g/ml. In contrast, galactan B-1.25 showed no inhibition effect against HSV replication. These galactans did not have anticoagulant activity. The mode of action of B-1.5 can be ascribed to an inhibitory effect on virus absorption. The presence of 6-sulfate groups seems to be important in order to give rise to antiviral activity.

## RESUMO

A alga *Bostrychia montagnei* foi submetida a extrações aquosas, na temperatura de 25°C e a 85°C. As frações polissacarídicas purificadas representam aproximadamente 17% do peso da alga seca. A galactose é o principal monossacarídeo presente nestas frações (64,8 - 73,7 moles%). 3,6-anidrogalactose e seu derivado 2-O-metil, estão presentes em pequena quantidade (13,3 - 18,5 moles%), assim como, outras unidades metiladas, tais como, 6-O-metil (6,4 - 7,9 moles%) e 2-O-metilgalactose (0,2 - 2,2 moles%). Também foi observada a presença de unidades de xilose (3,6 - 7,3 moles%) e glucose (1,0 - 2,8 moles%). Os polissacarídeos solúveis em água (25°C) foram separados por cromatografia de troca iônica em seis frações com rotação ótica específica negativa. A análise conjunta de metilação e espectroscopia de R.M.N.-<sup>13</sup>C demonstraram que as frações B-1,25 e B-1,5 são constituídas por unidades repetitivas alternadas de  $\beta$ -D-galactopiranose 3-O-substituída e  $\alpha$ -L-galactopiranose 4-O-substituída, característica do tipo ágar. As unidades D- em B-1,25 e em B-1,5 são parcialmente sulfatadas em C-6 (27% e 43%), em C-4 (29 e 25%) e metiladas em C-6 (8 e 12%, respectivamente). Aproximadamente, 36% das unidades L-, em B-1,25, e 26%, em B-1,5, estão presentes como 3,6-anidrogalactose; 28%, em B-1,25, e 37%, em B-1,5, como unidades de L-galactose 3-sulfato. A galactana sulfatada B-1,5 apresentou atividade antiherpética ( $IC_{50}$  5,5  $\mu$ g/ml para HSV-1 e 6,2  $\mu$ g/ml para HSV-2) sem afetar a viabilidade das células Vero, até a concentração de 1000  $\mu$ g/ml. De modo distinto, a galactana B-1,25 não demonstrou atividade contra os vírus HSV-1 e 2. Estas galactanas não apresentaram atividade anticoagulante. A fração B-1,5 exerce sua ação impedindo a adsorção viral. A porcentagem de grupos sulfato em C-6, das unidades de  $\beta$ -D-galactopiranose, pode estar correlacionada com a atividade antiherpética.

## **1 INTRODUÇÃO**

---

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Polissacarídeos das Algas Vermelhas

As algas vermelhas (Rhodophytas) pertencem a uma divisão de plantas inferiores, contendo mais de 4.000 espécies, sendo na maioria macrófitas marinhas (USOV, 1992). No entanto, de modo semelhante as plantas superiores, a parede celular das algas marinhas é constituída por um sistema de duas fases: uma fase cristalina (esqueleto) que está embebida em outra fase amorfa denominada matriz.

A parede celular das algas difere das plantas superiores pela predominância dos componentes da matriz em relação aos do esqueleto e pela maior quantidade de polissacarídeos polianiônicos em relação aos polissacarídeos neutros. A presença de polissacarídeos sulfatados ocorre freqüentemente na parede celular das algas marinhas enquanto que, em plantas superiores e mesmo em algas de água doce os polissacarídeos aniônicos não estão presentes (KLOAREG & QUATRANO, 1988).

Segundo KLOAREG e QUATRANO (1988), os polissacarídeos da matriz das algas marinhas estão relacionados com a regulação osmótica ou iônica, adaptando as algas ao meio marinho.

Na maioria das espécies de algas vermelhas a celulose está presente como componente do esqueleto da parede celular. A porcentagem deste polímero é baixa (1 - 8% do peso seco do talo), o que difere consideravelmente da quantidade presente em plantas superiores

(freqüentemente em torno de 30%) (PRESTON, 1974). A presença de celulose verdadeira, isto é, um polímero constituído apenas por unidades de  $\beta$ -D-glucose 4-O-substituída, foi confirmada em poucas espécies de algas vermelhas (WHYTE & ENGLAR, 1981).

Como polissacarídeo de reserva as algas vermelhas apresentam um polímero constituído por  $\alpha$ -D-glucose, “amido das florídeas”, cuja porcentagem varia entre as espécies. De acordo com seu grau de substituição pode ser correlacionado à amilopectina de plantas superiores ou ao glicogênio animal. Em geral, o “amido” de Rhodophytas não apresenta o componente linear amilose no entanto, este foi identificado recentemente, como polímero contaminante, na ordem Bangiales e Porphyridiales (USOV, 1992).

Algumas espécies da algas vermelhas contêm xilanas, solúveis em água ou em álcali, constituídas por uma cadeia linear contendo ligações (1→3) e (1→4)- $\beta$ -D-xilopiranose. As xilanas são freqüentemente isoladas de algas pertencentes a ordem Palmariales e Nemaliales (MATULEWICZ & CEREZO, 1992).

Enquanto os polissacarídeos biossintetizados pelas algas estão total ou parcialmente relacionados em sua estrutura com os das plantas terrestres, as galactanas sulfatadas isoladas de Rhodophytas, como ágares e carragenanas, não apresentam nenhuma similaridade com os polímeros das plantas terrestres (USOV, 1992).

## 1.2 Galactanas de Rhodophytas

### 1.2.1 Estrutura geral

Os polissacarídeos de algas têm sido amplamente estudados embora, em poucas espécies tenham sido investigados detalhadamente sob o ponto de vista estrutural. Os alginatos, extraídos das algas pardas (Phaeophyta), e as galactanas de algas vermelhas (Rhodophyta) têm sido alvo de atenção devido seu valor econômico.

O interesse por estes polissacarídeos deve-se ao fato que, dependendo de sua estrutura são capazes de formar soluções altamente viscosas ou géis rígidos, que permanecem estáveis. Estes polímeros podem ser usados pela indústria alimentícia, de papel, têxtil e petroquímica, entre outras (PEARSON, 1995).

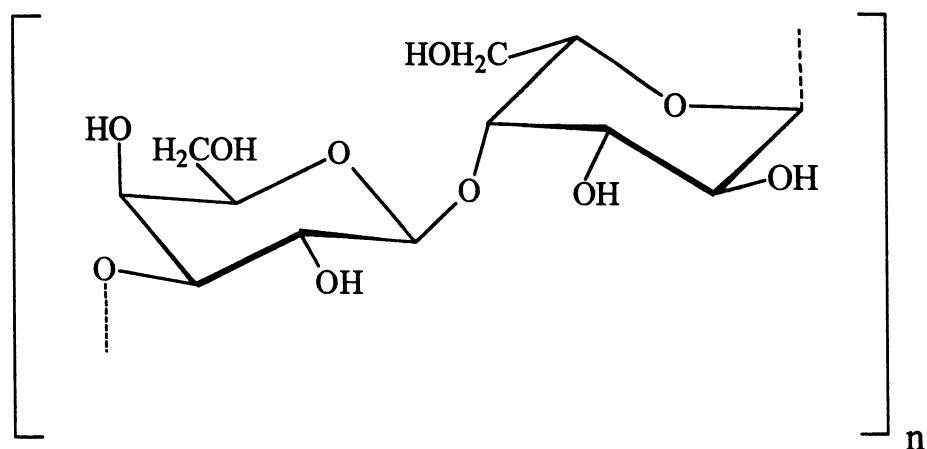
As galactanas são os principais polissacarídeos constituintes da matriz das algas vermelhas. Estes polissacarídeos apresentam uma estrutura comum, sendo constituídas por uma cadeia linear alternada de (1→3)- $\beta$ -D-galactopiranose, denominada unidade A e por unidades de (1→ 4)- $\alpha$ -galactopiranose, unidade B (PAINTER, 1982). As unidades B podem estar parcial ou totalmente na forma de 3,6-anidrogalactose.

De acordo com a estereoquímica da unidade B, as galactanas podem ser classificadas em dois grupos: galactanas do tipo ágar, onde esta unidade pertence a série L- (FIGURA 1) e o tipo carragenana, onde as unidades B pertencem a série D- (FIGURA 2) (PAINTER, 1983).

Existem ainda galactanas cuja unidade 4-O-substituída pode ser tanto da série D- como L- (MILLER et al., 1997).

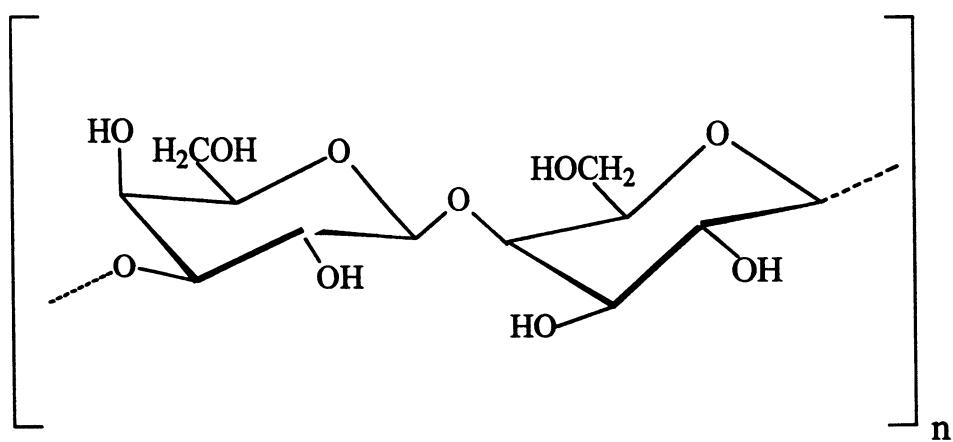
**FIGURA 1. GALACTANA, TIPO ÁGAR, COM UNIDADES D- E L- ALTERNANTES.**

**Unidade A (D-galactose) Unidade B (L-galactose)**



**FIGURA 2. GALACTANA, TIPO CARRAGENANA, COM UNIDADES D- ALTERNANTES.**

**Unidade A (D-galactose)      Unidade B (D-galactose)**



A estrutura básica e repetitiva das gaiactanas é geralmente modificada por diferentes tipos de substituintes, tais como: O-sulfato, O-metil, O-glicosil e acetal de ácido pirúvico (USOV, 1992).

Em relação aos grupos substituintes algumas generalizações podem ser feitas: as carragenanas geralmente não apresentam grupos metil, com exceção das  $\beta$ -carragenanas, mas são altamente substituídas por grupos sulfato em determinadas posições. A exata posição desta substituição permite definir o tipo de carragenana. Os ágares geralmente são menos sulfatados que os anteriores porém, altamente metilados, com possibilidade de substituintes como ácido pirúvico e unidades de xilose.

### **1.2.2 Galactanas Tipo Carragenana**

As carragenanas apresentam propriedades físico-químicas (formam géis e soluções de alta viscosidade) que determinam a importância econômica destes ficocolóides, sendo utilizadas pelas indústrias alimentícia, cosmética, química, têxtil entre outras (PEARSON, 1995). São obtidas a nível industrial principalmente das rodofícias da ordem Gigartinales dos gêneros *Chondrus*, *Gigartina*, *Eucheuma*, *Iridaea* e *Hypnea* assim como, da ordem Cryptonemiales, do gênero *Kallymenia* (CHOPIN et al. 1994).

Em 1953, SMITH & COOK em estudos realizados com as algas *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata* diferenciaram as carragenanas em duas frações: uma insolúvel em KCl 0,125M, denominada *kappa*-carragenana, rica em 3,6-anidrogalactose, e outra solúvel nesta solução que

recebeu a denominação de *lambda*-carragenana, pobre em 3,6-anidrogalactose.

Segundo REES (1963), a *kappa*-carragenana é formada pela estrutura repetitiva de  $\beta$ -D-galactose 4-sulfato e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose e a *lambda*-carragenana por unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato e  $\alpha$ -D-galactose 2,6 dissulfato. De acordo com O'NEILL (1955), pequenas quantidades de D-glucose e D-xilose poderiam ser consideradas impurezas provenientes de contaminação pelo amido das florídeas e xilana.

Após estes estudos tornou-se usual denominar as diferentes carragenanas utilizando as letras do alfabeto grego. Recentemente, KNUTSEN et al., (1994) estabeleceram um novo sistema para classificação das galactanas de rodofícias, tentando esclarecer e ampliar os parâmetros de classificação já que, a usual não inclui uma denominação para os polissacarídeos do tipo ágar. Além disso, STORTZ e CEREZO (1992), propuseram a possibilidade de 42 diádes teóricas para as carragenanas, tornando impossível denominar todas estas estruturas com as letras do alfabeto grego.

Embora, a localização dos grupos sulfato na unidade A das carragenanas seja uma das maneiras utilizadas para a classificação destes polissacarídeos, como por exemplo: *lambda*-carragenana (D-galactose 2-sulfato), *kappa*-carragenana (D-galactose 4-sulfato), ômega-carragenana (D-galactose 6-sulfato), existem carragenanas que não apresentam grupos sulfato, denominadas *beta*, que estão constituídas por unidades de D-galactose (unidade A) e D-3,6 anidrogalactose (unidade B) (USOV et al., 1980).

A presença de grupos substituintes, tais como, O-metil e acetal de ácido pirúvico têm sido observados em carragenanas (USOV, 1992; CHIOVITTI, 1997).

CHOPIN et al., (1994) estabeleceram a provável estrutura da galactana extraída da alga *Kallymenia westii*, demonstrando tratar-se de uma carragenana semelhante ao tipo *lambda*. O valor positivo (+ 62,8) da rotação ótica específica, indica predominância do isômero D- sobre o L-galactose. Esta galactana, de estrutura complexa, apresenta baixos teores de 3,6-anidrogalactose (1,7%), 4-O-metilgalactose, além de, ácido pirúvico (0,55%) na unidade 3-O-substituída. Ressalta-se que estes substituintes são pouco comuns em carragenanas.

Em 1996, CHIOVITTI, et al., demonstraram a presença de *iota*-carragenanas (sulfato em C-2 das unidades de (1→ 4)- $\beta$ -D-galactose) altamente metiladas, extraídas da parede celular das algas *Rhadonia coccinea* e *Rhadonia verticillata* (Solieriaceae). Estes polissacarídeos são ricos em 6-O-metilgalactose (31% e 17%, respectivamente), o que os torna distintos de outras carragenanas obtidas da família Solieriaceae, devido ao alto teor de grupos O-metil.

Na família Solieriaceae, além das carragenanas metiladas, foram isoladas carragenanas altamente piruvatadas, (CHIOVITTI et al., 1997) demonstrando que, esta família sintetiza carragenanas com substituintes diferentes dos usualmente presentes nas galactanas do tipo carragenana. Estes autores investigaram diferentes espécies do gênero *Callophyicus*, nas quais, o teor de piruvato variou de 8,0 - 10,5%, dependendo da espécie. Os estudos de metilação demonstraram que, as unidades de D-galactose 3-O-

substituídas (apresentando acetal de ácido pirúvico ligado às posições O-4 e O-6) e as unidades de 3,6-anidro D-galactose sulfatadas em C-2, eram os principais componentes destas carragenanas. Portanto, as galactanas obtidas do gênero *Callophycus* caracterizam-se pela presença desta nova unidade dissacarídica repetitiva.

Na mesma família, Solieriaceae, a carragenana obtida de *Eucheuma gelatinae*, embora classificada por GREER & YAPHE (1984) como uma *beta*-carragenana, apresenta adicionalmente unidades repetitivas características de *kappa*-carragenana, (KNUTSEN & GRASDALEN, 1992) sendo portanto, denominada híbrida do tipo *kappa-beta*-carragenana. Outro tipo de carragenana híbrida, identificada em *Furcellaria lumbricalis*, apresenta estruturas características de *kappa*, *beta* e ômega-carragenana (USOV & ARKHIPOVA, 1981).

### 1.2.3 Galactanas Tipo Ágar

O segundo tipo de galactanas obtidos de algas vermelhas é denominado ágar. Estes polissacarídeos de estrutura complexa são extraídos principalmente dos gêneros, *Gelidium*, *Gracilaria*, *Achanthopeltis*, *Ceramium* e *Pterocladia*. Estes polímeros têm importância econômica devido a sua habilidade de formar gel em baixa concentração (PEARSON, 1995).

Contém uma cadeia principal, formada por unidades de (1→3)- $\beta$ -D-galactopiranose e unidades de (1→4)- $\alpha$ -L-galactopiranose, podendo estar a unidade B na forma de seu derivado 3,6-anidro (3,6-anidrogalactose) (PAINTER, 1982).

ARAKI & HIRASE (1960), separaram o ágar de *Gelidium amansii* em duas frações: um polímero neutro, denominado agarose, apresentando uma estrutura linear regular constituída por unidades alternadas de (1→3)- $\beta$ -D-galactose (Unidade A) e (1→4)-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose (Unidade B) e uma fração carregada, denominada agarpectina. Nesta, algumas das unidades B estão “trocadas” por L-galactose sulfatada, e parte das unidades de D-galactose apresentam substituição por ácido pirúvico. Na fração de agarpectina os autores observaram ainda, a presença de ácido D-glucurônico. Portanto, segundo ARAKI E HIRASE o ágar era constituído apenas por dois tipos de polissacarídeos: agarose e agarpectina.

Posteriormente, DUCKWORTH & YAPHE (1971) em estudos realizados com algas dos gêneros *Gracilaria*, *Gelidium*, *Acanthopeltis*, *Ceramium* e *Pterocladia*, demonstraram que o ágar é uma mistura complexa de polissacarídeos, contendo desde polímeros neutros, com a estrutura ideal da agarose proposta por ARAKI E HIRASE, até polímeros altamente carregados. Segundo os autores, o ágar é constituído dos seguintes extremos de estruturas:

(“a”) agarose neutra: tendo a estrutura proposta por ARAKI E HIRASE, ou seja, unidades de  $\beta$ -D-galactose 3-O substituída e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 4-O substituída.

(“b”) agarose piruvatada: com reduzido grau de sulfatação, onde parte das unidades de D-galactose estão substituídas por 4,6-O-(1-carboxietilideno)-D-galactose até uma relação de aproximadamente 1:20, neste caso, a unidade B apresenta-se substituída por até 2% de grupos O-sulfato em C-6.

(“c”) galactana sulfatada: contendo pouca ou nenhuma unidade de 3,6-anidrogalactose ou 4,6-O-(1-carboxietilideno)-D-galactose, havendo um aumento gradual da sulfatação em C-6 na unidade B.

A porcentagem de polissacarídeos com as estruturas (“a”, “b” ou “c”) varia de acordo com a espécie, idade, estágio de desenvolvimento da alga assim como, com a época da coleta (MOURADI-GIVERNAUD et al., 1992).

Adicionalmente, as gaiactanas tipo ágar apresentam substituição por grupos O-metil principalmente em C-6 da unidade A e em C-2 da unidade B (2-O-metil-3,6-anidrogalactose e 2-O-metilgalactose). O grau de substituição e o tipo dos substituintes das gaiactanas tipo ágar têm correlação direta com sua propriedade geleificante. Deste modo, a agarose é o componente do ágar com maior poder de geleificação enquanto que, a presença progressiva de maiores teores de grupos sulfato (até chegar ao extremo da estrutura “c”) ocasiona uma drástica diminuição na força do gel (YAPHE & DUCKWORTH, 1972; WHYTE et al., 1981).

Embora esta correlação tenha sido observada entre os diferentes ágares estudados, MOURADI-GIVERNAUD et al., (1992) demonstraram que a força do gel da agarose, isolada de *Gelidium latifolium*, não estava relacionada com sua composição química. Esta galactana, cuja composição não variou em relação a época da coleta, caracterizava-se pelo baixo grau de substituição (3,7-4,9%; 1,3-2,6% e 2,1-2,6% de 6-O-metil-D-galactose, 2-O-metil-L-galactose e grupos sulfato, respectivamente) e apresentava uma força de gel de 400 gcm<sup>-2</sup> em Março e de 800 gcm<sup>-2</sup> em Outubro. A força do gel desta agarose foi relacionada com sua massa molecular já que, a composição da galactana permaneceu constante no período em que foi observada esta variação.

Na ordem Ceramiales, principalmente na família *Rhodomelaceae*, é freqüente a presença de polissacarídeos cuja estrutura é uma variante da agarose, enquanto que, na ordem Cryptonemiales são freqüentemente encontradas galactanas modificadas, que se assemelham estruturalmente tanto às carragenanas quanto aos ágares. Estas últimas têm sido denominadas galactanas híbridas do tipo ágar-carragenana ou carrágar (KNUTSEN et al, 1994).

Os primeiros estudos sobre galactanas de Ceramiales foram realizados por BOWKER & TURVEY (1968). Estes autores isolaram da *Rhodomelaceae* *Laurencia pinnatifida* um polissacarídeo sulfatado (39% de sulfato) constituído por, D-galactose (28%), 6-O-metil-D-galactose (18%), L-galactose (9%), 2-O-metil-L-galactose (17%), 3,6-anidrogalactose e 2-O-metil-3,6-anidrogalactose (38%). Os grupos sulfato estavam localizados principalmente em C-6 das unidades de L-galactose e de 2-O-metil-L-

galactose. A unidade D-galactose apresentava-se sulfatada em C-2. Embora a presença de D- e L-galactose metiladas tenha sido anteriormente informada em polissacarídeos de algas, esta foi a primeira vez em que se identificou 6-O-metil-D-gaiactose sulfatada. A localização das unidades de xilose e ácido D-galactourônico não foi determinada nesta galactana.

De outra espécie de Laurencia, (*L. nipponica Yamada*), USOV & ELASHIVILI (1991) isolaram uma galactana sulfatada com estrutura complexa do tipo ágar. Este polissacarídeo é constituído por 51 unidades de 3,6-anidrogalactose, 10 unidades de xilose, 7 unidades de 2-O-metil-3,6-anidro-L-galactose, 2 unidades de 6-O-metilgalactose e uma unidade de 3-O-metilgalactose para cada 100 unidades de galactose. Embora em baixa porcentagem, foi possível determinar a exata posição da xilose (em C-3 da unidade B, galactose 6-sulfato) através do isolamento de pentassacarídeos contendo xilose, obtidos por hidrólise redutiva parcial. Um destes foi um pentassacarídeo dissulfatado apresentando 3 unidades de galactose para 1 de xilose e 1 de 3,6-anidrogalactitol. A estabilidade dos grupos sulfato em C-6, em meio alcalino (indicando substituição em C-3), junto com o sinal de C-1 da unidade de  $\beta$ -D-xilopiranose (101,0 ppm), confirmaram a localização das unidades de xilose neste polissacarídeo. Diferente posicionamento das unidades de xilose (em C-4 da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranose) foi observada em *Laurencia undulata* (HIRASE et al., 1982).

Em outra espécie da família Rhodomelaceae, *Chondria macrocarpa*, isolou-se uma xilogalactana constituída principalmente por galactose (69 moles%) além de, 3,6-anidrogalactose (17 moles%) e xilose (14 moles%) (FURNAEUX & STEVENSON, 1990). As unidades B deste polissacarídeo

estão presentes como 3,6-anidro-L-galactose (aproximadamente 40 moles%), L-galactose 6-sulfato (aproximadamente 25 moles%) e L-galactose (26 moles%). Neste polissacarídeo a xilose encontra-se em C-3 das unidades de L-galactose 6-sulfato, como em *L. nipponica*.

Utilizando RMN-<sup>13</sup>C MILLER & FURNEAUX (1997) determinaram a estrutura de agaróides obtidos de diferentes espécies de algas pertencentes a ordem Ceramiales. Os autores demonstraram que, em *Euptilota formosissima* e *Streblocladia glomerulata* há total substituição em C-6, das unidades A, por grupos metil e sulfato, respectivamente. Um padrão diferente foi observado em *Polysiphonia abscissoides*, onde 70% destas unidades estavam sulfatadas e 11% metiladas. Estas três espécies de Ceramiales, apresentavam o polissacarídeo nativo com 12% (*E. formosissima*) e 19% (*S. glomerulata*) das unidades 4-O-substituídas como unidade precursora de 3,6-anidro-L-galactose, ou seja, L-galactose 6-sulfato.

Na galactana de *Polysiphonia strictissima* o espectro de RMN-<sup>13</sup>C não apresentou os sinais referentes a L-galactose 6-sulfato, ou seja, 103,4; 101,0 e 67,4 ppm referentes ao C-1 da D-galactose ligada a L-galactose 6-sulfato e ao C-1 e C-6 da L-galactose 6-sulfato, respectivamente. Este polissacarídeo caracteriza-se por apresentar a unidade B não substituída (sinal em 79,5 ppm). Segundo os autores, a interpretação dos espectros de RMN-<sup>13</sup>C foi facilitada devido a presença de poucos sinais, permitindo elucidar sua estrutura.

O polissacarídeo de *Ceramium rubrum*, família Ceramiaceae, estudado por TURVEY & WILLIANS (1976) apresenta um alto teor de 6-O-metil-D-galactose (21%) e 28% de D-galactose sendo que, esta última

unidade encontra-se quase totalmente sulfatada em C-6, semelhante a galactana de *S. glomerulata* (MILLER & FURNEAUX, 1997). No entanto, uma diferença marcante em *Ceramium rubrum* é a presença de unidades B (80%) não substituídas por grupos sulfato, o que impossibilita a ciclização destas unidades em 3,6-anidrogalactose.

Em 1967, ARAKI et al. isolaram de *Gelidium amansii*, pela primeira vez, uma galactana sulfatada contendo 4-O-metil-L-galactose. A presença deste derivado metilado foi posteriormente observada em outras galactanas isoladas de algas da ordem Cryptonemiales, como de *Aeodes orbitosa* (NUNN & PAROLIS, 1968) e *Aeodes ulvoidea* (ALLSOBROOK et al., 1971). Este polissacarídeo apresenta uma estrutura complexa, assim como, outros da ordem Cryptonemiales, sendo constituído predominantemente por D-galactose (83%) além de, 2-O-metil-D-glactose (8%) e 4-O-metil-L-galactose (9%). Parte das unidades de D-galactose-4-O-substituídas (21%), apresentavam uma ramificação em C-6 por unidades do monossacarídeo 4-O-metilado. Ressalta-se que neste polissacarídeo todas as unidades A e B pertencem a série D-.

A presença de L-galactose foi observada em outras famílias de algas desta mesma ordem (Cryptonemiales), como a *Kallymenia bergreenii* (MILLER & FURNEAUX, 1996), que apresenta a unidade B na forma de D- e L-galactose em uma relação de 3:1, além de, 2-O-metilgalactose (1 mol%), 6-O-metil-galactose (5 moles%), 3,6-anidrogalactose, seu derivado 2-O-metilado (25 moles%) e xilose (5 moles%). Em outra espécie da família *Kallymeniaceae*, *Kallymenia westii* (CHOPIN et al., 1994), foi isolada uma galactana altamente sulfatada apresentando galactose e baixos níveis de

3,6-anidrogalactose, com uma relação molar galactose: 3,6-anidrogalactose: sulfato de 1: 0,04: 1,89. A presença de ácido pirúvico (0,55%) e 4-O-metilgalactose, embora em baixa porcentagem, além da ausência de 2-O-metilgalactose e 6-O-metilgalactose, distingue a galactana de *K. westii* da galactana de *K. bergeronii*.

Outras famílias da ordem Cryptonemiales (Halymeniaceae, Solieraceae e Lamentariaceae) também apresentam polissacarídeos de estrutura complexa, onde as unidades B podem tanto ser da série L- como da série D-. A galactana de *Pachymenia himantophora* (Halymeniaceae) foi investigada por PENNAN & REES (1973) e PAROLIS (1981), os quais determinaram a presença de  $\alpha$ -D-galactose,  $\beta$ -D-galactose sulfatadas, nas posições 2,4 e 2,6 além de, 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-galactose-6-sulfato.

No entanto, MILLER et al., (1995) investigando outra espécie do mesmo gênero, *P. lusoria*, obtiveram resultados diferentes. O polissacarídeo desta espécie apresenta alta porcentagem de monometilados, 5 moles% de 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 21 moles% de 6-O-metilgalactose e 18 moles% de 2-O-metilgalactose, além de, 8 moles% de piruvato e baixo nível de unidades dissulfatadas (D-galactose 2,6 dissulfato, 6 moles%).

As unidades B podem estar representadas por 3,6-anidro-L-galactose (10 moles%), 2-O-metil-L-anidrogalactose (5 moles%), 2-O-metil-D-galactose e galactose tanto na forma D- quanto L- (15 moles%).

Posteriormente, MILLER et al., (1997) utilizaram a análise dos monossacarídeos constituintes e espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C para estabelecer a presença de derivados monometilados e de monossacarídeos

da série L-, em várias espécies de algas do gênero *Pachymenia*. Em todas as espécies estudadas observou-se a presença de 6-O-metil-D-galactose, além de, 2-O-metil-L-galactose, 3,6-anidro-L-galactose e seu derivado 2-O-metil. Segundo os autores, o teor de 6-O-metilgalactose foi importante para classificação taxonômica, permitindo identificar que a espécie descrita como *P. lusoria*, coletada em diferentes regiões da Nova Zelândia, pertence na verdade a duas espécies distintas.

Finalmente ressalta-se que, embora as galactanas descritas apresentem uma estrutura básica comum, ou seja,  $\beta$ -galactose-3-O-substituída e  $\alpha$ -galactose-4-O-substituída, o grau e o tipo de substituições origina diferentes galactanas sulfatadas as quais, apresentam diferentes propriedades físico-químicas e provavelmente biológicas. Deste modo, para o estudo da atividade biológica, assim como, de possíveis aplicações industriais, é de fundamental importância o conhecimento da estrutura química fina.

### **1.3 Atividade antiviral**

A atividade antiviral de polissacarídeos de diversas fontes têm sido estudada ao longo dos anos. Nas últimas décadas, numerosos autores têm demonstrado que polissacarídeos aniônicos e outros poliânions têm potente atividade antiviral *in vitro*. Estes inibidores podem ter origem de fontes naturais (biológicos) ou sintéticas e sua carga negativa pode ser conferida

pela presença de sulfato, fosfato ou grupos carboxila (WITVROW, et al., 1994).

A atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados foi relatada pela primeira vez em 1958 por GERBER et al., o qual demonstrou que os ovos embrionados eram protegidos contra o vírus influenza B e o vírus da caxumba, na presença de polissacarídeos extraídos do ágar, obtido de *Gelidium cartilagenum*, e da carragenana obtida de *Chondrus crispus*.

Nas décadas seguintes, vários polissacarídeos sulfatados tais como, dextran sulfato, heparina e glicosaminoglicana provaram ser inibidores da replicação dos vírus: herpes simplex, vírus da febre amarela, vírus Influenza A e B e do vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).

No início dos anos 60, NAHMIAS & KIBRICK (1964), demonstraram que a heparina, na concentração mínima de 1 a 2 unidades/ml, tem efeito inibidor sobre o vírus herpes simplex, *in vitro*, interferindo na fase inicial da infecção. Sua ação se daria provavelmente na fase de adsorção, durante a ligação iônica, interagindo com as cargas positivas presentes no vírus ou na superfície celular, inibindo portanto a ligação do vírus à célula. Este efeito é diretamente dependente do grau de sulfatação e do baixo grau de polimerização da molécula. Segundo os autores, quando há um grupo sulfato por unidade de hexose no polissacarídeo, o efeito máximo de inativação é alcançado. Homopolissacarídeos sulfatados têm sido mais ativos do que os heteropolissacarídeos. O estudo revelou também que este polissulfato não possui capacidade de inativar diretamente o vírus (NAHMIAS, et al., 1964).

TAKEMOTO & SPICER (1965), comprovaram a ação dos ágares, polissacarídeos sulfatados, como inibidores virais *in vitro* dos picornavírus,

arbovírus, mixovírus e herpesvírus. Os resultados demonstraram que a concentração de ágar necessária para a inibição viral varia de acordo com o vírus em estudo.

Nos anos 80, após o isolamento e identificação do vírus HIV, responsável pela síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA), intensificaram-se os estudos empregando polissulfatos como inibidores virais.

NAKASHIMA et al., (1987) demonstraram que diferentes tipos de polissacarídeos ácidos (carragenanas, heparina, dermatan sulfato, heparan sulfato) são capazes de inibir a atividade da enzima transcriptase reversa dos retrovírus. Neste estudo os autores realizaram ensaios de inibição da transcriptase reversa, utilizando polissacarídeos sulfatados, do tipo *lambda*-carragenana contendo 20% de sulfato, extraídos da alga *Schizymenia pacifica*. Os resultados comprovaram que a *lambda*-carragenana tem maior atividade inibitória do que a heparina e outros polissacarídeos ácidos. Segundo os autores os polissacarídeos sulfatados, incluindo extratos de algas e outros tipos de carragenanas, podem suprimir a infecção pelo HIV devido a interferência na adsorção viral e inibição da transcriptase reversa.

Segundo UENO & KUNO, (1987) o dextran sulfato (massa molecular 7.000 - 8.000, contendo 17-20% de sulfato) é um potente antiviral, *in vitro*, contra o HIV, capaz de agir sinergicamente com azidotimidina (AZT).

Os polissacarídeos extraídos de algas marinhas têm sido freqüentemente associados com atividade antiviral *in vitro*. EHRESMANN et al., (1977) e RICHARDS et al., (1978) observaram que polissacarídeos de

algumas espécies de algas marinhas apresentavam efeitos inibidores sobre o HSV.

GONZÁLEZ et al., (1987) estudaram o efeito da *íota-carragenana* (Sigma Chemical) sobre a adsorção do HSV-1 e sobre a síntese proteica das células infectadas com este vírus. Contrariando estudos anteriores, os autores sugerem que a carragenana previne a síntese de proteínas virais porque bloqueia fases posteriores da replicação porém, segundo o autor, não impede a adsorção e internalização viral.

Estudos *in vitro* realizados com polissacarídeos das algas vermelhas *Nothogenia fastigiata*, (DAMONTE et al., 1994), *Aghardhiella tenera* (WITVROUW et al., 1994), *Pterocladia capillaceae*, (PUJOL et al., 1996) e *Porphyridium cruentum* (MINKOVA et al., 1996), demonstraram que estes polissacarídeos têm eficiente atividade antiherpética. Estas moléculas podem atuar tanto no meio extracelular, afetando a adsorção viral, como no meio intracelular, inibindo a síntese de enzimas virais. Embora o processo de adsorção à célula do hospedeiro não esteja totalmente elucidado, tem sido demonstrado que a interação inicial ocorreria através da ligação da glicoproteína viral gC ao proteoglicano heparan sulfato da membrana celular. A ação inibitória destes carboidratos deve-se a interferência na interação gC-heparan sulfato, um receptor comum aos tipos celulares suscetíveis ao HSV.

Os polissacarídeos sulfatados obtidos de algas representam uma rica fonte de compostos com atividade antiviral, no entanto, estudos *in vivo* ainda precisam ser aprimorados para comprovar sua eficácia terapêutica.

### 1.3.1 Herpesvírus

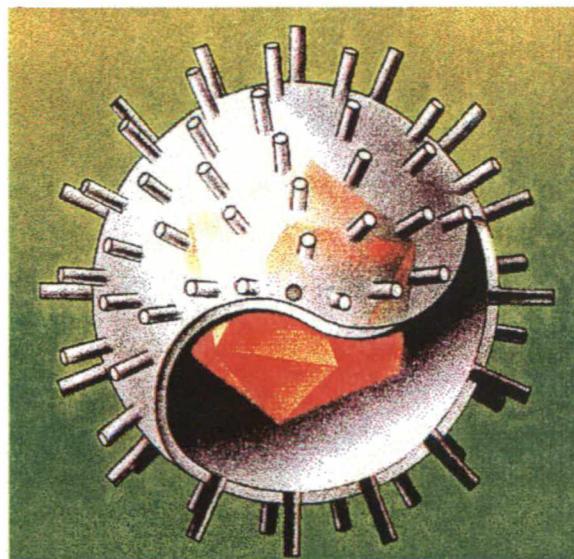
Os vírus herpes simplex fazem parte da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*. Esta subfamília é constituída por dois gêneros: *Simplexvírus*, herpes simplex tipo 1 e tipo 2, sendo estes sorotipos isolados por SCHUNEWIESS há mais de quarenta anos e o gênero *Varicellavirus* (vírus varicella-zoster). Os herpesvírus podem causar infecções do tipo: líticas, persistentes, latentes ou transformadoras. A infecção latente, com subsequente doença recorrente, é uma característica destes vírus. Os vírus herpes simplex foram os primeiros vírus humanos descobertos e estão entre os vírus mais intensamente estudados. O nome **herpes** deriva de uma palavra grega que significa arrastar. A presença de “úlceras frias” foi descrita na antigüidade e sua etiologia viral foi estabelecida em 1919. O termo **simplex** pode ter sido criado para distinguir as lesões de aparência mais benignas, causadas por este vírus, da condição clínica de herpes zoster, causado pelo vírus varicella-zoster. Os dois tipos de HSV (tipo 1 e 2), compartilham vários抗ígenos comuns porém, possuem glicoproteínas específicas que os distinguem (MURRAY, et al., 1992).

Os herpesvírus são formados por: a) uma parte central denominada cerne, contendo uma dupla fita linear de ácido desoxirribonucleico (DNA), com 150 kilopares de bases; b) um capsídeo icosaédrico com aproximadamente 100-110nm de diâmetro; c) material assimétrico, amorfo, contendo proteínas, que circunda o capsídeo, denominado tegumento e d)

d) um envelope lipoproteico contendo espículas em sua superfície formadas por glicoproteínas.

Seu tamanho varia de 120nm a 300nm, esta variação deve-se as diferentes espessuras do tegumento. Estudos realizados com cepas purificadas do HSV-1 demonstraram que este vírus possue aproximadamente 33 proteínas designadas de polipeptídeos virais (VP), que recebem denominação numérica, dentre estas proteínas 8 são glicoproteínas de superfície (FIGURA 3).

**FIGURA 3. VÍRUS HERPES SIMPLEX**



Fonte: Catálogo Abbot Diagnostic

### 1.3.2 Replicação viral

Para iniciar a infecção o vírus se liga aos receptores celulares por meio das proteínas gB e gC, o envelope viral se funde à membrana plasmática e segue-se a penetração do nucleocapsídeo, associado às proteínas do tegumento no citoplasma. Estudos do grupo de SPEAR e colaboradores, demonstram que um dos receptores reconhecidos pelo vírus é o proteoglicano heparan sulfato (WUDUNN & SPEAR, 1989).

Sequencialmente, o vírus é transportado ao núcleo onde o DNA viral é liberado e circulariza, dando início a primeira fase da transcrição gênica. A fusão à membrana libera duas proteínas do vírion que estão associadas ao tegumento: proteínas  $\alpha$ -TIF (fator de indução-trans do gene  $\alpha$ ) e a proteína VHS, que são transportadas ao núcleo e induzem a transcrição dos genes iniciais, denominados alfa ( $\alpha$ ), dando início a fase precoce imediata da replicação.

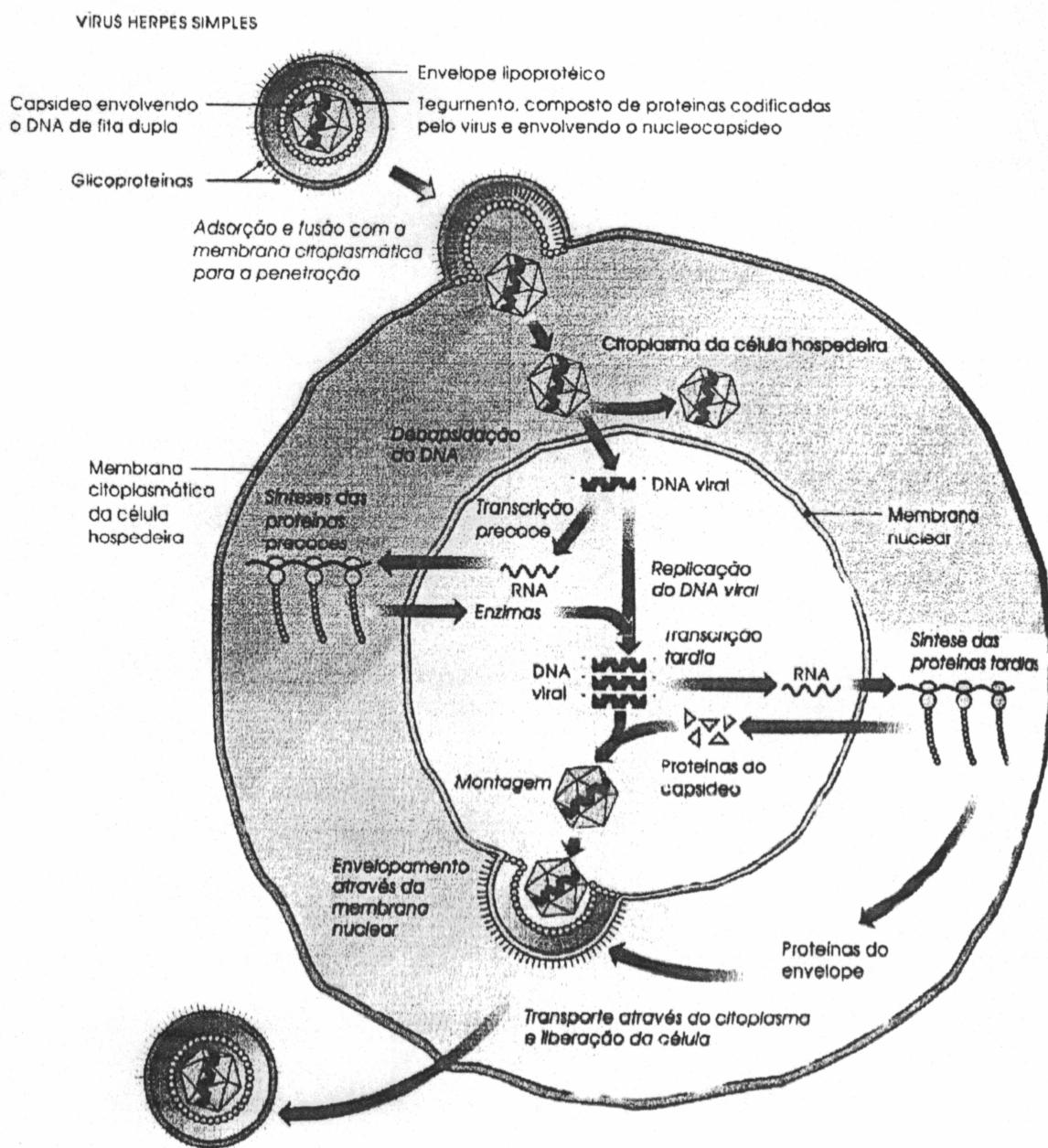
A síntese de proteínas celulares é bloqueada pela ação da proteína VP1, que está associada ao complexo ligado à seqüência terminal do DNA viral. A tradução das proteínas precoces imediatas- $\alpha$  é necessária para a ativação da região  $\beta$  do genoma (precoce- $\beta$ ). Neste estágio a cromatina celular é degradada e o nucléolo torna-se desagregado. As  $\beta$ -proteínas bloqueiam a síntese das proteínas  $\alpha$  e levam à transcrição de RNAm tardios ( $\gamma$ ), que resultarão em proteínas estruturais e proteínas reguladoras, inibindo

a síntese de proteínas  $\beta$ . Os produtos do gene  $\beta$  são as enzimas necessárias para a replicação do DNA viral. Entre estas proteínas estão a timidino-quinase, a DNA-polimerase e uma proteína receptora para a fração cristalizável da imunoglobulina G (receptor Fc), que aparece na superfície das células infectadas. Este tipo de replicação viral é denominado em cadeia porque as proteínas virais, cerca de 50, são sintetizadas por regulação coordenada do DNA viral, em três fases dependentes uma da outra (FIELDS, 1990; OLIVEIRA, 1994).

O DNA do HSV consiste de dois segmentos ligados covalentemente, denominados de longo (L) e curto (S). O DNA é replicado por um mecanismo de rolamento que resulta em intermediários replicativos. Inicia-se então a fase tardia da replicação, onde o último grupo de proteínas, proteínas- $\gamma$ , é transcrito. As glicoproteínas e as proteínas do tegumento se acumulam na membrana nuclear. Os capsídeos contendo DNA se ligam à parte interna da membrana e brotam no espaço perinuclear, apresentando envelope. As partículas virais (vírion) se acumulam no retículo endoplasmático e são transportadas para o espaço extracelular.

A liberação do vírus deve ocorrer por fagocitose reversa ou através dos poros das membranas do aparelho de Golgi. Estudos *in vitro*, demonstraram que cada célula libera de  $10^4$  a  $10^5$  partículas virais, das quais apenas 100 são infecciosas (FIELDS, 1990). Durante a infecção latente a replicação viral não evolui além da fase precoce imediata (FIGURA 4).

**FIGURA 4. REPLICACÃO DO VÍRUS HERPES SIMPLEX**



Fonte: OLIVEIRA, L. H. S. *Virologia Humana*, 1994.

## 1.4 *Bostrychia montagnei*: Polióis e Taxonomia

*Bostrychia* é um gênero de algas vermelhas que ocorre em mangues, sobre pedras expostas durante a maré baixa, e em pântanos de regiões tropicais temperadas ou frias. Estas macroalgas estão sujeitas a dessecação e a uma grande variação da salinidade, devido as repetidas imersões e emersões resultantes do ciclo das marés.

As algas do gênero *Bostrychia*, FIGURA 5, sintetizam hexitóis, D-sorbitol (glucitol) e ou D-dulcitol (galactitol) (KREMER, 1976). Estes carboidratos representam uma fonte de substrato rapidamente disponível para a cadeia respiratória. Segundo KARSTEN & KIRST (1989) e KIRST (1990) estes compostos estão envolvidos na manutenção da pressão osmótica por um mecanismo ainda não esclarecido.

*Bostrychia montagnei* Harvey é uma espécie restrita ao Atlântico Tropical e sintetiza ambos os tipos de hexitóis: D-dulcitol 55 µmol/g e D-sorbitol 38 µmol/g, em relação ao peso da alga seca. A posição taxonômica desta espécie está relacionada a seguir:

Divisão : Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

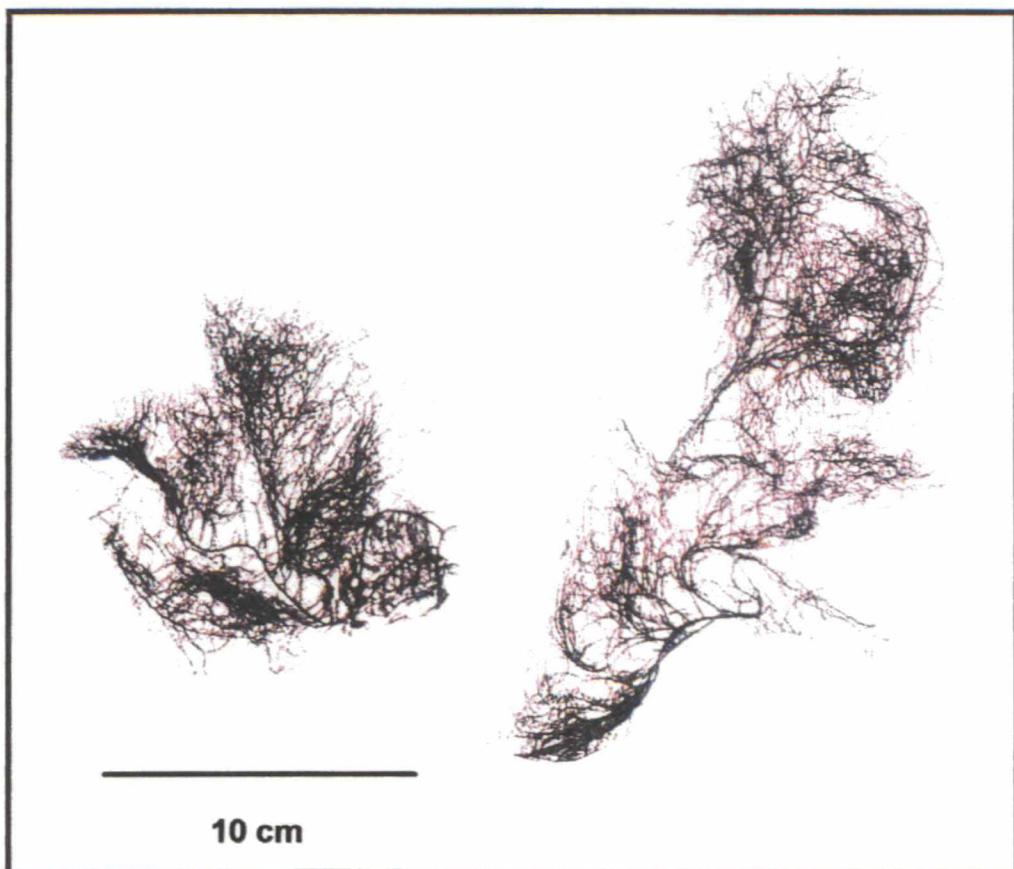
Subclasse: Florideae

Ordem: Ceramiales

Família: Rhodomelaceae

Gênero: *Bostrychia*

**FIGURA 5. ALGA *Bostrychia montagnei***



## **2 OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

A alga vermelha *Bostrychia montagnei* pertence a ordem Ceramiales.

A investigação da estrutura química dos polissacarídeos de algas pertencentes a esta ordem tem sido realizada com certa intensidade nos últimos 4 anos pelos grupos de FURNEAUX e colaboradores e USOV e colaboradores. No entanto, é a primeira vez que os polissacarídeos biossintetizados pelas algas do gênero *Bostrychia* são investigados.

Este trabalho de tese tem como objetivos o estudo dos polissacarídeos solúveis em água da alga *Bostrychia montagnei* (fase tetraesporofítica) e a avaliação da ação antiviral e anticoagulante destes polissacarídeos, como detalhado abaixo:

1. Extração e purificação dos polissacarídeos sulfatados, solúveis em água.
2. Caracterização química dos polissacarídeos.
3. Determinação da atividade antiherpética e anticoagulante das frações obtidas, após purificação.
4. Investigação da estrutura química do(s) polissacarídeo(s) com atividade antiherpética.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3.1 Coleta da Alga**

A alga vermelha *Bostrychia montagnei*, FIGURA 5, foi coletada na Ilha do Mel-PR, lavada com água doce, limpa manualmente, seca ao sol e moída em moinho de faca (WILEY MILL) utilizando malha de 0,5 mm.

### **3.2 Tratamento com Solventes Orgânicos**

A alga seca e moída (160,5g) foi submetida a extração com metanol 85% (360 ml) a 60°C por 1 hora e 30 minutos, sob refluxo. Este procedimento foi repetido 4 vezes para remoção de pigmentos, lipídeos e carboidratos de baixa massa molecular. Após centrifugação o sobrenadante metanólico, denominado B-MeOH, foi concentrado até secura, resuspensos em água e liofilizado.

### **3.3 Extração dos Polissacarídeos Solúveis em Água**

O resíduo deslipidificado e despigmentado, obtido após a extração metanólica, foi submetido a 4 extrações sucessivas com água destilada (1000 ml) a 25°C sob agitação mecânica por 36 horas. Após extração, o material foi centrifugado (4.500 rpm/20 minutos) e o sobrenadante precipitado com etanol (3 volumes). Após a liofilização, os polissacarídeos obtidos foram reunidos, solubilizados em água e centrifugados. A pequena

porção de material insolúvel foi desprezada e o sobrenadante, após diálise exaustiva contra água destilada, foi liofilizado e denominado de B-CW.

O resíduo da extração aquosa a temperatura de 25°C foi sequencialmente submetido a 4 extrações sucessivas com água destilada (1000 ml) a 85°C por 4 horas. Os extratos aquosos, após extração a temperatura de 85°C, foram submetidos aos mesmos tratamentos da extração anterior, obtendo-se a fração B-HW.

O etanol utilizado para a precipitação das frações polissacarídicas, B-CW e B-HW, foi evaporado a pressão reduzida, solubilizado em água e dialisado. Após centrifugação (4.500 rpm/20 minutos) o material solúvel foi liofilizado e denominado de B-CWE e B-HWE, respectivamente.

### **3.4 Métodos Analíticos Gerais**

- O grupo sulfato foi determinado pelo método de DODGSON (1961), após a hidrólise das amostras com HCl 1M (5h, 105°C).
- O grau de polimerização dos polissacarídeos foi estimada pelo método de PARK & JOHNSON (1949).
- A determinação das proteínas foi realizada com o reativo de Folin-Ciocalteau, segundo o método de LOWRY et al. (1951).
- As dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando-se como padrão galactose na concentração de 70 µg/ml.

- O teor de 3,6-anidrogalactose das frações submetidas ao tratamento alcalino foi determinado pelo método do resorcinol (YAPHE & ARSENAULT, 1965), utilizando padrão de frutose na concentração de 50 µg/ml.
- O método colorimétrico de BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973) foi empregado para determinação de ácidos urônicos.
- A determinação das rotações óticas foi realizada em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autopol III, a 25°C utilizando amostras na concentração de 0,2g% em água.
- A determinação do poder de geleificação foi realizada a 4°C e a 25°C, por 15 horas, utilizando os polissacarídeos na concentração 0,2g%, na ausência e na presença de KCl (concentração final 2M).
- As diálises foram realizadas contra água corrente (aproximadamente 24h) e em seguida contra água destilada, renovada várias vezes até completa ausência de sais (NaCl, KCl), através do teste de Cl<sup>-</sup> realizado com nitrato de prata.
- As pesagens foram realizadas em balança analítica SAUTER, modelo KG-7470, METTLER TOLEDO, modelo AB204 e HEKMAC HM1000.
- As evaporações sob pressão reduzida foram realizadas em evaporador rotatório FISATOM, em temperatura de aproximadamente 40°C.
- As centrifugações foram realizadas nas centrífugas CELM, modelo LS-II1053 e BECKMAN, modelo J21B.
- As determinações espectrofotométricas foram realizadas em aparelho COLEMAN JÚNIOR, modelo 6A e BECKMAN-DU-2.

- As medidas de concentração hidrogeniônica (pH) foram realizadas em potenciômetro MICRONAL, modelo B222.
- As liofilizações ocorreram em aparelhos CRYOLISER (New Brunswick Scientific Co. Inc.) e EDWARDS.
- As análises estatísticas dos testes de atividade anticoagulante foram realizadas por meio do Teste de Análise de Variância e para os ensaios de atividade antiviral utilizou-se o Teste de Proporção de Grupo com Duas Categorias Mutualmente Exclusivas.

### **3.5 Métodos Cromatográficos**

#### **3.5.1 Cromatografia de Gel Permeação:**

Para análise de homogeneidade da fração polissacarídica B-CW utilizou-se uma coluna contendo Sepharose 4B (Sigma, 39,5cm x 1,0cm). O fluxo do eluente (NaCl 0,9g%) foi de 1 ml/5 minutos.

Utilizou-se uma coluna de Sepharose 4B (Sigma, 39,5cm x 1,0cm), para a análise de homogeneidade das frações B-água, B-1,25, B-1,5, B-4,0 e B-NaOH. O fluxo do eluente (água destilada) foi de 1ml/8 minutos.

O volume morto de ambas as colunas foi determinado com dextrana, massa molecular de 2 milhões.

### **3.5.2 Cromatografia de Troca Iônica.**

O fracionamento de B-CW foi realizado em coluna de troca iônica DEAE-Sephadex A-50 (Sigma, 41,0cm x 5,6cm), utilizando como eluentes água, NaCl (0,75M - 4,0M), uréia 6,0M e NaOH 0,5M.

A eluição foi realizada em etapas até apresentar o teste de fenol-ácido sulfúrico negativo com cada eluente (DUBOIS et al., 1956).

### **3.5.3 Cromatografia líquido-gasosa (C.G.)**

As análises por cromatografia gasosa (C.G.) foram realizadas em Cromatógrafo Hewlett Packard 5890, com detector de ionização de chama (300°C) e injetor (250°C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm de d. i.), revestida com DB-225 (0,25 µm) em diferentes temperaturas: as análises cromatográficas para acetatos de alditol foram realizadas na temperatura de 220°C e as amostras de acetatos de alditol parcialmente metilados a 210°C.

### **3.5.4 Cromatografia Líquido-Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (C.G.-E.M.)**

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (C.G.-E.M.) foram realizadas em um cromatógrafo a gás "Varian", modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa da

marca Finnigan Mat, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225 da marca J.W.

As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C, por um minuto, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40°C min.<sup>-1</sup> até 230°C, mantendo-se constante a partir deste valor.

Utilizou-se o gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1ml.min<sup>-1</sup>. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/e 90 a 220. Este método foi utilizado para a quantificação de acetatos de alditol (SLONEKER, 1972), identificados por meio dos seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976), comparados com padrões.

### **3.5.5 Métodos Espectroscópicos**

#### **3.5.5.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (R.M.N.-<sup>13</sup>C)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (R.M.N.-<sup>13</sup>C) foram obtidos na freqüência base de 100,16 MHz, no espectroscópio da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400. O intervalo de aquisição do sinal foi de 0,6 segundos tendo sido feitas, em

média, 100K aquisições. Utilizou-se intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

As amostras (40 mg) foram dissolvidas em D<sub>2</sub>O e colocadas em tubos de 150mm de comprimento e 10mm de diâmetro para análise no espectroscópio a temperatura de 70°C.

Os deslocamentos químicos, expressos em δ (p.p.m), foram determinados utilizando acetona como padrão interno (δ = 30,2).

### **3.6 Hidrólise Ácida Total do Tipo Hidrólise Redutiva**

Para análise quantitativa conjunta dos monossacarídeos neutros e de 3,6-anidrogalactose, os polissacarídeos (4 mg) foram submetidos a hidrólise ácida total de acordo com o método de STEVENSON & FURNEAUX (1991). Neste método utiliza-se o agente redutor, estável em meio ácido, borano-4-metil-morfolina. Este reagente tem a finalidade de reduzir a unidade de 3,6-anidrogalactose em 3,6-anidrogalactitol, protegendo-a da degradação em meio ácido. Os monossacarídeos foram analisados por C.G.-E.M. na forma de acetato de alditóis.

### **3.7 Metilação dos Polissacarídeos na Forma de Sal de Trietilamônio.**

A metilação foi realizada de acordo com o método de CIUCANU & KEREK (1984), utilizando iodometano deuterado (ICD<sub>3</sub>, Sigma). Antes de iniciar a metilação os polissacarídeos (25-50 mg) foram percolados em uma

coluna de Dowex 50 x 8, previamente tratada com solução de trietilamina 5% (10 ml) e em seguida eluída com água até pH 5,0. Deste modo é possível recuperar o polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio, que passa então a ser solúvel no solvente utilizado para a metilação (DMSO).

O processo de metilação foi realizado em 3 etapas, ou seja, adicionou-se NaOH pulverizado (100-200 mg) e ICD<sub>3</sub> (300-500 µl), seguido de agitação magnética por 30 minutos a 25°C. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. O material metilado (resultado da 1<sup>a</sup> série de metilações) foi dialisado e liofilizado. Foram realizadas 3 séries de metilações, cada série com 3 etapas.

A hidrólise redutiva do polissacarídeo metilado foi realizada pelo método de STEVENSON & FURNEAUX (1991) e analisada por C.G.-E.M. como descrito no item 3.5.4.

### **3.8 Tratamento Alcalino**

As galactanas (B-1,25 e B-1,5) foram solubilizadas em água destilada (0,2 g%), reduzidas com boroidreto de sódio (10% em relação a massa das galactanas) e mantidas a 4°C por 12 horas. Após este período adicionou-se novamente boroidreto de sódio 3M (concentração final 1M). Esta solução foi mantida a 80°C em banho termostatizado (PHARMACIA BIOTECH, modelo- Multi Temp III) por 4 horas.

O acompanhamento da reação foi realizado pela determinação do teor de 3,6-anidrogalactose, até obtenção de um valor constante, utilizando o método do resorcinol (YAPHE & ARSENAULT, 1965).

Depois de submetidas ao resfriamento, diálise e liofilização as frações B-1,25 e B-1,5 apresentaram rendimento de 82,2% e 84,6%, respectivamente.

Após o término do tratamento (4 horas) as galactanas foram submetidas a hidrólise redutiva (STEVENSON & FURNEAUX, 1991) para determinar o teor de 3,6-anidrogalactose por C.G.-E.M., como descrito no item 3.5.4.

### **3.9 Análise da Atividade Biológica**

#### **3.9.1 Análise da Atividade Antiviral**

##### **3.9.1.1 Cultura de Células**

Foram utilizadas cultura de Células Vero (Células de rim de macaco africano: *Cercopithecus aethiops*) crescidas em meio Mínimo Essencial Eagle (Sigma), suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Cultilab) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Para o meio de manutenção utilizou-se SBF na concentração de 1,5%. Periodicamente investigou-se a presença de micoplasma no Setor de Bacteriologia do Hospital de Clínicas-UFPR.

### **3.9.1.2 Vírus Herpes Simpex**

Os testes de atividade antiviral foram realizados no Laboratório de Virologia da Universidad de Buenos Aires, sob a orientação do Dr. Carlos Pujol, e no Setor de Virologia do Hospital de Clínicas-UFPR.

Utilizou-se vírus Herpes simplex do tipo 1 (cepa F) e do tipo 2 (cepa G), provenientes de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, U.S.A), sendo a caracterização dos vírus confirmada pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando anticorpos monoclonais (Biosoft). O inóculo viral consistia de 100 unidades formadoras de placa (UFP), obtido por titulação em células Vero pelo método de determinação do número de placas (CANDEIAS, 1996).

### **3.9.1.3 Ensaio de Toxicidade**

A toxicidade das frações polissacarídicas para as células Vero foi determinada pelo método colorimétrico do formazam (DESSELBERGER, 1995), utilizando o reagente sal de tetrazólium-MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenil tretrazolium bromide, azul de tiazolil), (Sigma). A concentração citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) foi determinada como a concentração do polissacarídeo capaz de reduzir o número de células viáveis em 50% em relação as células controle.

### **3.9.1.4 Ensaio de Atividade Antiviral**

A atividade antiviral das frações polissacarídicas foi determinada *in vitro* pelo método de redução do número de placas (CANDEIAS, 1996). Para o ensaio, monocamadas confluentes de células Vero crescidas em placas de 24 poços, foram infectadas com 100 UFP de vírus por poço na presença e na ausência de diferentes concentrações das frações polissacarídicas. Após 1 hora de incubação (na temperatura de 37°C para ensaio de atividade e a 4°C para ensaio de adsorção), o inóculo foi removido e adicionou-se meio de manutenção contendo 0,7% de metil celulose na presença ou na ausência das frações polissacarídicas. No ensaio da atividade durante a replicação viral os polissacarídeos foram adicionados especificamente na etapa em estudo. Após incubação das microplacas por 48 horas a 37°C em estufa com ambiente de CO<sub>2</sub>, estas foram coradas com cristal violeta 1% e contou-se o número de placas virais formadas. A concentração inibitória 50 (CI<sub>50</sub>) foi determinada como a concentração da fração polissacarídica capaz de reduzir a citopatogenicidade do vírus em 50% quando comparada ao controle.

Para os ensaios de atividade utilizou-se as frações polissacarídicas em concentração 5 vezes maior que a CI<sub>50</sub>. A análise estatística foi realizada por meio do Teste de Proporção de Grupo com Duas Categorias Mutualmente Exclusivas.

Com a finalidade de determinar a atividade da fração B-1,5 sobre a cinética de adsorção do HSV-2 (G) às células Vero, a monocamada celular foi cultivada em frasco “vial” e infectada com 80 UFP/ml do vírus na presença

e na ausência da fração B-1,5 (50 µg/ml). Os viais foram mantidos a 4°C, por tempo determinado. Após o período de adsorção programado as monocamadas foram lavadas e congeladas a -70°C por 24 horas. Sequencialmente realizou-se o ensaio de redução do número de placas.

### **3.9.2 Ensaio de Atividade Anticoagulante**

A atividade anticoagulante foi avaliada *in vitro*, através do teste de Tempo de Trombina (TT) e de Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), (DOANE & WHISTLER, 1963; NISHINO et al., 1991). Utilizou-se *pool* de plasma humano normal e heparina padrão obtida de mucosa intestinal bovina (massa 12 KD e 150 UI/mg). Os ensaios foram realizados a 37°C em fibrômetro STAGO, modelo ST4, utilizando reagentes de kits comerciais. As frações polissacarídicas foram diluídas em solução salina 0,9 g% na concentração de 3,1-100 µg/ml de plasma.

Os testes foram realizados no Laboratório do Hospital de Clínicas-UFPR, no Setor de Hematologia, com o auxílio da Dra. Lismara Bonfim. A análise estatística foi realizada por meio do Teste de Análise de Variância.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

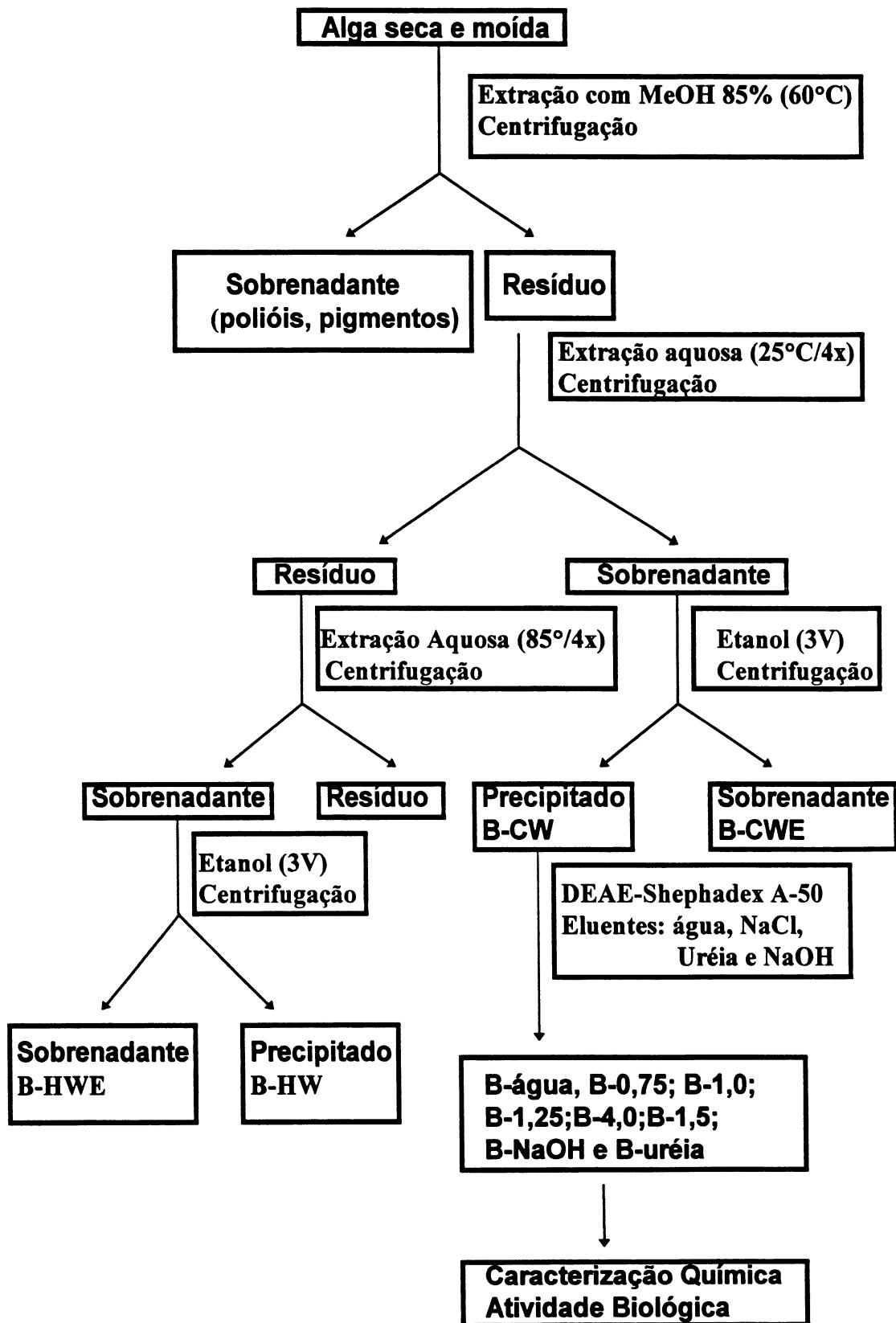
A macroalga vermelha *Bostrychia montagnei*, coletada na Ilha do Mel-PR, após seca foi submetida a extração com solventes orgânicos (metanol 85% a 60°C) para remoção de lipídeos, hexitóis e sais. Após centrifugação, o sobrenadante metanólico foi concentrado, ressuspenso em água e liofilizado, denominando-se B-MetOH (20,8g; 13% de rendimento em relação a alga seca e moída) (ESQUEMA 1).

O resíduo obtido, após deslipidificação, despigmentação e remoção de carboidratos de baixa massa molecular, foi submetido a 4 extrações com água a temperatura de 25°C. Os extratos aquosos foram reunidos, resuspensos em água e centrifugados, sendo o sobrenadante tratado com etanol (3V) para a precipitação da fração polissacarídica denominada de B-CW. Seqüencialmente a alga residual foi tratada com água a temperatura de 85°C (4 vezes) para obtenção dos polissacarídeos solúveis em água quente, B-HW, de maneira semelhante a descrita anteriormente.

Os sobrenadantes etanólicos (B-CWE e B-HWE), provenientes da precipitação de B-CW e B-HW, respectivamente, foram concentrados parcialmente a pressão reduzida, dialisados exaustivamente contra água destilada e liofilizados. Os rendimentos destas frações estão na TABELA 1, os quais totalizam aproximadamente 17% em relação a alga seca.

**ESQUEMA 1. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS**

**DA ALGA *BOSTRYCHIA MONTAGNEI*.**



O rendimento obtido está de acordo com o esperado (em média 20% do peso da alga seca). Segundo MOURADI-GIVERNAUD, (1992) e MILLER & FURNEAUX, (1997) a porcentagem de polissacarídeos pode variar de acordo com a época de coleta da alga. Ressalta-se no entanto que, as extrações com água (25°C e 85°C) foram realizadas até a obtenção do menor rendimento em polissacarídeos (análise visual do material precipitado com etanol). Além disso, este é o primeiro estudo sobre polissacarídeos do gênero *Bostrychia* portanto, outros parâmetros, como época de coleta, não estão disponíveis para fins comparativos com a espécie em estudo ou outras espécies do mesmo gênero.

Com a finalidade de verificar a propriedade geleificante, as quatro frações polissacarídicas, B-CW, B-HW, B-CWE e B-HWE (0,2 g%), foram mantidas a temperatura ambiente e a 4°C por 15 horas. Nestas condições não houve formação de gel bem como, quando adicionou-se KCl (até a concentração final de 2M).

A geleificação da agarose e de galactanas do tipo ágar ocorre tanto a temperatura ambiente como a 4°C enquanto que, a maioria das carragenanas geleificam apenas na presença de íons potássio. Estes experimentos demonstram que os polissacarídeos em água, de *B. montagnei*, são diferentes das carragenanas típicas e da agarose.

A análise da composição em monossacarídeos demonstrou que as frações polissacarídicas de *Bostrychia montagnei* são constituídas predominantemente por galactose (64,8 - 73,7 moles%), além de outros monossacarídeos neutros (TABELA 2), sendo ainda, desprovidas de ácido urônico. O valor de negativo de rotação específica (-35,0 a -49,7), TABELA

1, e a presença de grupos O-sulfato (17,0 - 23,5%), indicam que estas frações contêm galactanas do tipo ágar.

**TABELA 1. ANÁLISE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DE *BOSTRYCHIA MONTAGNEI*.**

	<b>B-CW</b>	<b>B-HW</b>	<b>B-CWE</b>	<b>B-HWE</b>
<b>Rendimento (%)<sup>a</sup></b>	6,0	6,5	2,2	2,5
<b>Carboidratos (% anidro)<sup>b</sup></b>	57,7	44,8	52,2	45,9
<b>Sulfato (NaSO<sub>3</sub>)<sup>c</sup></b>	23,0	17,0	21,0	18,8
<b>Proteína (%)<sup>d</sup></b>	1,7	3,9	3,8	1,5
<b>GP<sup>e</sup></b>	27.500	45.700	29.500	16.500
<b>[<math>\alpha</math>] D (°)<sup>f</sup></b>	-40,8	-49,7	-35,0	-42,5

a = rendimento em relação a alga seca e moída.

b, c, d, e = determinado pelo método de: Fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al, 1956), DOGSON (1961), LOWRY et al. (1951) e PARK & JOHNSON (1949), respectivamente.

f = a rotação ótica foi determinada em água com as frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g%.

**TABELA 2. COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DE *BOSTRYCHIA MONTAGNEI*.**

Fração	Gal	Monossacarídeos <sup>a</sup> (moles %)							Glc
		3,6-AG <sup>b</sup>	2-Me	6-MeG	2-MeG	Xil	Man		
B-CW	73,7	10,2	3,1	6,4	0,2	3,6	tr. <sup>c</sup>	2,8	
B-HW	64,8	13,3	5,0	7,9	2,2	5,8	----	1,0	
B-CWE	65,4	14,5	4,0	7,3	0,5	7,3	----	1,0	
B-HWE	69,2	12,9	3,7	7,0	1,0	5,2	----	1,0	

a = Determinado por análise de C.G.-E.M. na forma de acetato de alditol, utilizando prévia hidrólise redutiva (STEVENSON & FURNEAUX, 1991).

b = Gal, 3,6 AnGal, 2-Me-3,6-AG, 6-MeG, 2-MeG, Xil, Man e Glc referem-se a: galactose 3,6-anidrogalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 6-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, xilose, manose e glucose, respectivamente.

c = traços (tr.= menor que 0,2%).

d = não detectado.

As galactanas de algas vermelhas contêm variável teor de 3,6-anidrogalactose, podendo chegar a 50% na agarose [extremo estrutural "a" de DUCKWORTH & YAPHE, (1971)]. Uma vez que estas unidades são rapidamente destruídas em condições ácidas, utilizou-se o processo de hidrólise redutiva, desenvolvido por STEVENSON & FURNEAUX (1991), para a quantificação conjunta de 3,6-anidrogalactose e dos demais monossacarídeos neutros, por análise de C.G. Neste método utiliza-se o

agente redutor borano-4-metilmorfolina, que reduz a unidade de 3,6-anidrogalactose a 3,6-anidrogalactitol, que é estável em meio ácido.

O teor de 3,6-anidrogalactose e seu derivado 2-O-metil-3,6-anidrogalactose nas frações de *Bostrychia montagnei* variou de 13,3 a 18,5 moles% (TABELA 2). Outros derivados metilados (6-O-metilgalactose e 2-O-metilgalactose) também estão presentes (6,6 - 10,1 moles %). Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito nas galactanas da ordem Ceramiales, nas quais têm sido relatado a presença de 3,6-anidrogalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogalactose e de monometilados em porcentagens que variam de 17 - 45 moles% e de 1,3 - 21 moles%, respectivamente, dependendo da espécie da alga em estudo (BOWKER & TURVEY, 1968; FURNEAUX & STEVENSON, 1990; TURVEY & WILLIANS, 1976).

O processo de extração com água a 85°C permitiu a obtenção da fração B-HW, a qual contém 35% a mais de derivados monometilados (6-O-metil e 2-O-metilgalactose) que a fração B-CW, obtida por tratamento com água a 25°C. B-HW, além destes monometilados em maior porcentagem, apresenta maiores teores de 3,6-anidrogalactose e 2-O-metil 3,6-anidrogalactose (18,3 moles%) do que os encontrados em B-CW (13,3 moles%).

Em outras galactanas, obtidas de algas da ordem Ceramiales, observam-se valores mais elevados de 6-O-metilgalactose: 12 moles% para *Polysiphonia lanosa* (BATEY & TURVEY, 1975) até 21 moles% em *Ceramium rubrum* (TURVEY & WILLIANS, 1976).

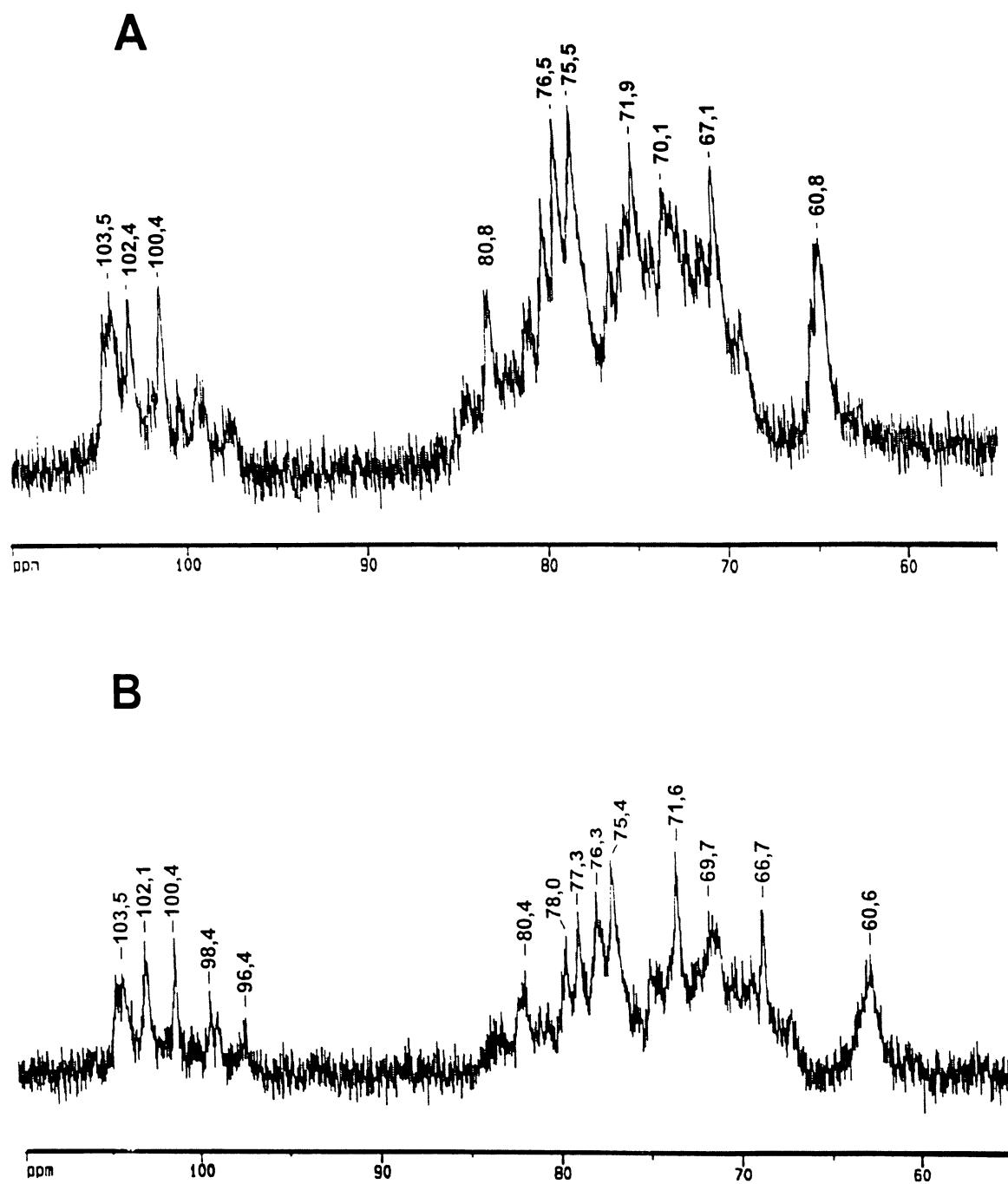
Xilose e glucose também estão presentes nas frações B-CW, B-HW, B-CWE e B-HWE ainda que em pequena porcentagem. A presença de

glucose é freqüente nos extratos de galactanas, obtidos de algas vermelhas, decorrente da contaminação por florideana (amido de Rhodophytas). Para reduzir este contaminante MILLER & FURNEAUX (1997), utilizam o tratamento com amiloglucosidase quando o teor de florideana é elevado. Como os polissacarídeos de *B. montagnei* apresentam baixa porcentagem de glucose, este tratamento enzimático não foi realizado.

Nas FIGURAS 6 e 7 estão os espectros de R.M.N.-<sup>13</sup>C das frações polissacáridicas B-CW, B-HW, B-CWE e B-HWE. Os sinais alargados e a baixa definição do espectro, demonstram a heterogeneidade química destas frações. Analisando a região anomérica de 90-110 ppm, é possível observar a presença dos mesmos grupos de sinais, indicando que as frações polissacáridicas apresentam os mesmos tipos de unidades. No entanto, a variação na intensidade relativa dos sinais indica que, as mesmas unidades encontram-se em diferentes proporções, em cada fração polissacáridica. O grupo de sinais em 60-61 ppm (região de carbono não substituído, C-6) indica a presença de unidades de galactose não sulfatada, metilada ou glicosilada em C-6.

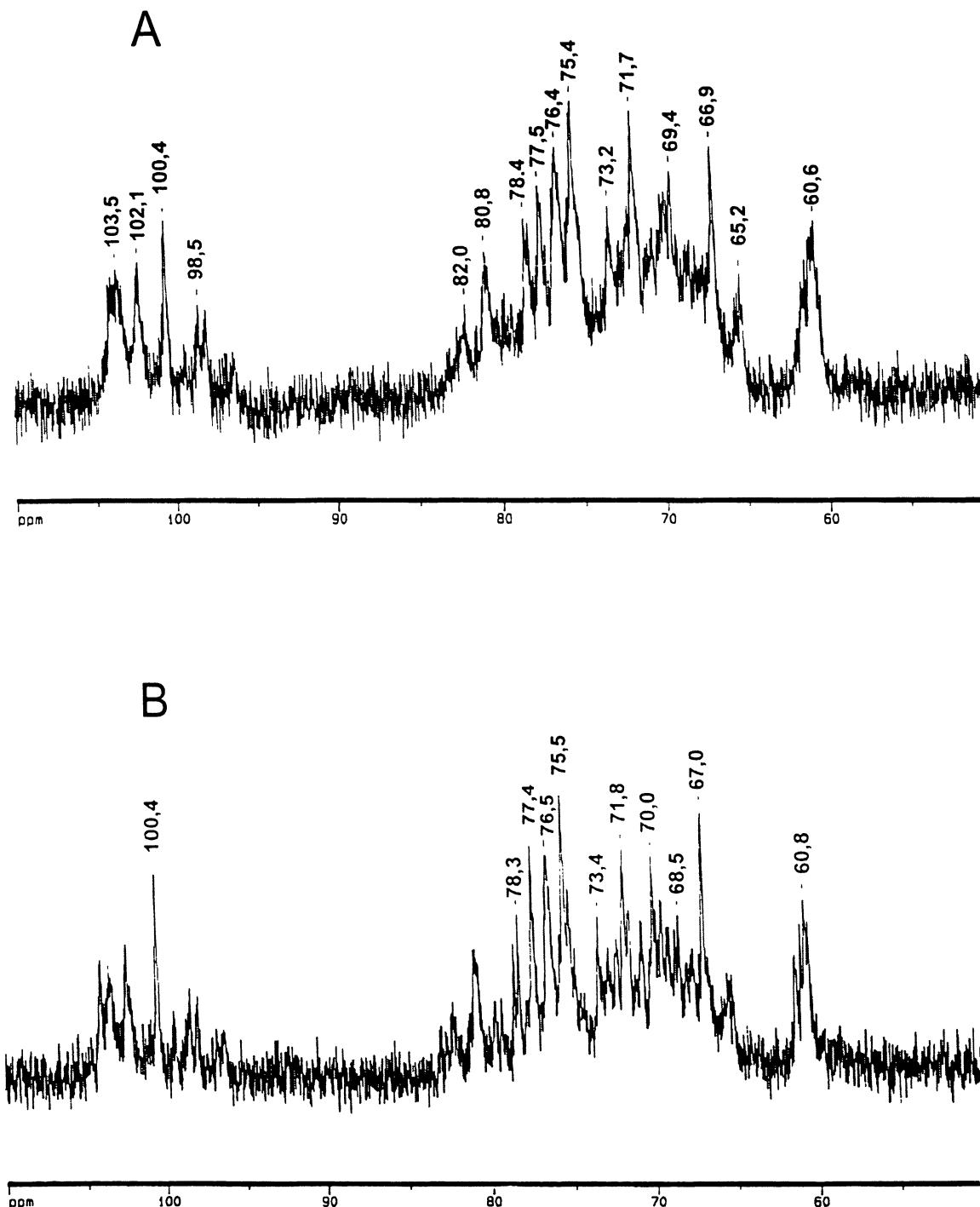
Com a finalidade de determinar o caráter polidisperso da fração B-CW, esta foi cromatografada em coluna Sepharose-4B. Como pode ser observado na FIGURA 8, esta fração apresenta vários componentes, os quais, não foram separados adequadamente neste tipo de gel.

**FIGURA 6. ESPECTRO DE R.M.N.-  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO B-CW (A) e B-CWE(B)<sup>1</sup>**



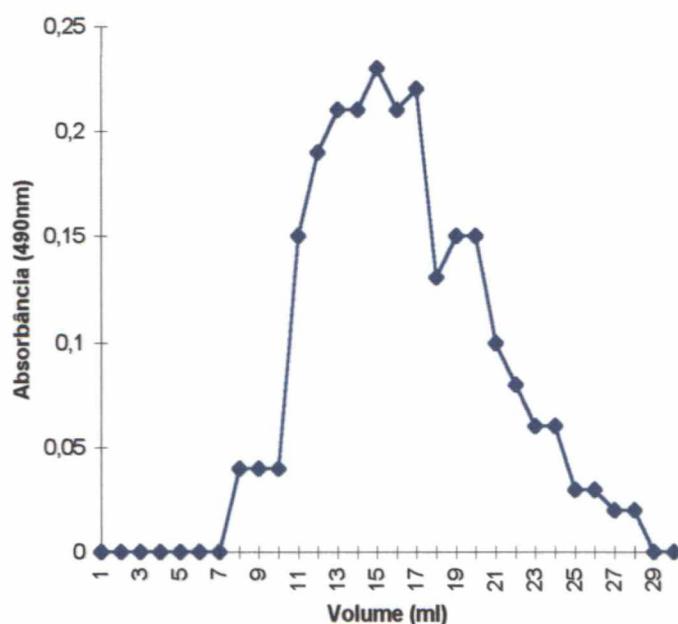
<sup>1</sup> = Análise realizada a 70°C, em  $\text{D}_2\text{O}$ , calibração utilizando acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração das amostras: 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**FIGURA 7. ESPECTRO DE R.M.N.-<sup>13</sup>C DA FRAÇÃO B-HW (A) e B-HWE(B)<sup>1</sup>**



<sup>1</sup> = Análise realizada a 70°C, em D<sub>2</sub>O, calibração utilizando acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração das amostras: 20 µg/ml.

FIGURA 8. CROMATOGRAFIA<sup>a</sup> EM SEPHAROSE-4B DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA B-CW DE *B. MONTAGNEI*.



<sup>a</sup> = Coluna Sepharose-4B;  $V_t = 25,11$  ml (39,5 x 1,0 cm).  
Eluente NaCl.  $V_0 = 10,5$  ml (Dextrana, massa molecular = 2 milhões)  
Concentração da amostra: 14,4 mg/ml.

O fracionamento de B-CW, devido ao caracter ácido das galactanas (grupos sulfato), foi realizado por cromatografia de troca iônica (DEAE Sephadex A-50, concentração da amostra 3,51g/300 ml). Foram utilizados os eluentes: água, NaCl (0,75-4,0M) uréia 6,0M e NaOH 0,5M, sendo obtidas 8 frações distintas (TABELA 3), todas contendo sulfato (11,2 - 24,0%). As frações majoritárias foram eluídas com NaCl 1,25M, 1,5M e NaOH 0,5M, correspondendo a um total de 62,3% da fração original. Um alto rendimento foi também obtido na fração B-água (24,6% em relação ao recuperado), a qual surpreendentemente, contém 13% de sulfato. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com a Rhodophyta *Porphiridium* sp., onde a fração eluída com água, de uma coluna DEAE-Sephadex, apresentou 15,1% de grupos sulfato (GERESH, et al., 1992).

Para análise da homogeneidade as frações foram submetidas a cromatografia em Shepharose 4B. Observa-se na FIGURA 9 que as frações eluiram em um pico simétrico, com exceção da B-NaOH, sendo portanto necessário realizar sua purificação (não incluída no presente trabalho). Ressalta-se que a determinação aproximada do grau de polimerização das frações B-1,25 e B-1,5, realizada pelo método de PARK & JOHNSON (1949), foram semelhantes (TABELA 5). No entanto, o diferente comportamento cromatográfico destas frações pode ser atribuído a formação de agregados em B-1,25.

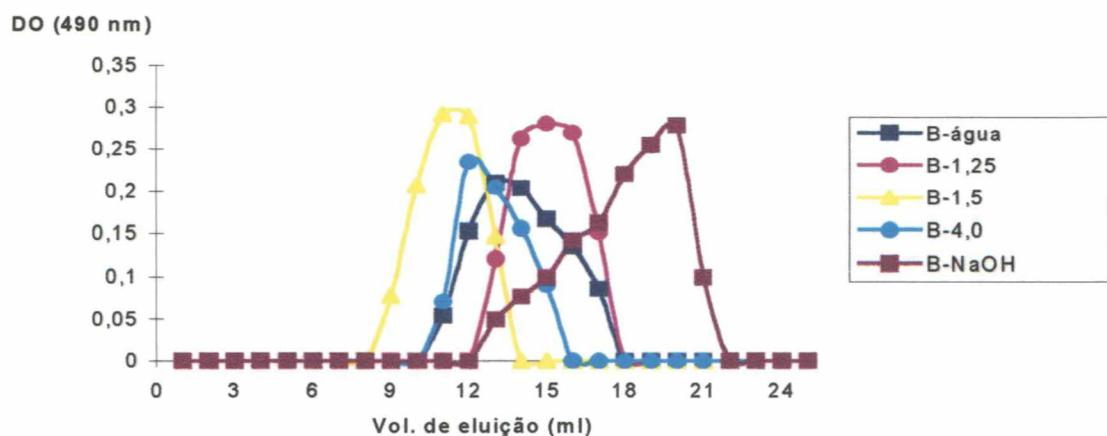
A análise da composição dos polissacarídeos de *Bostrychia montagnei* (TABELA 4) demonstra que, com exceção das frações B-uréia e B-NaOH todas as outras são constituídas principalmente por galactose (48,5 - 57,2 moles%) além de, 3,6-anidrogalactose (3,0 - 10,1 moles%), seu

derivado metilado em baixas porcentagens (2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 1,3 - 9,3 moles%) e de 6-O-metilgalactose (3,5 - 6,4 moles%). O derivado de galactose 2-O-metilado aparece em porcentagens traços (menos que 1%).

Em várias galactanas obtidas de algas vermelhas têm sido freqüente a presença de xilose (em variável porcentagem), como componente estrutural (TURVEY & WILLIANS, 1970; HAINES et al., 1990; FURNEAUX & STEVENSON, 1990). Nas galactanas de *Bostrychia montagnei* o teor de xilose variou de 1,8-17,5 moles %. Este último valor, mais elevado, foi observado apenas na galactana sulfatada B-0,75 que, embora não seja a principal fração de galactanas (rendimento de apenas 0,9%, TABELA 3), diferencia-se das demais por apresentar glucose (8,6 moles%), manose (3,0 moles%) e baixo grau de polimerização (GP = 5.600), TABELAS 4 e 5.

As galactanas eluídas com solução de NaCl, B-1,25 e B-1,5 representam 44,4% do total recuperado e são constituídas por: galactose, 3,6-anidrogalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 6-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, xilose e sulfato na proporção de: 52,3; 8,9; 5,7; 4,9; 0,6; 2,1; 25,5 e 55,5; 8,4; 2,2; 4,1; 0,8; 1,8; 27,2 moles%, respectivamente. Ainda que semelhantes em termos de composição em monossacarídeos, teor de grupos O-sulfato e grau de polimerização (TABELAS 4 e 5), estas frações responderam de maneira diferente ao tratamento alcalino, como será comentado posteriormente.

**FIGURA 9.** CROMATOGRAFIA<sup>a</sup> EM SEPHAROSE-4B DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS B-ÁGUA; B-1,25; B-1,5; B-4,0 E B-NaOH DE *B. MONTAGNEI*.



<sup>a</sup> = Coluna Sepharose-4B;  $V_t$  = 25,11 ml (39,5 x 1,0 cm).  
 Eluente água.  $V_0$  = 8 ml (Dextrana massa molecular = 2 milhões)  
 Concentração da amostra: 1 mg/ml.

**TABELA 3. RENDIMENTO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS  
POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA FRAÇÃO B-CW DE  
*BOSTRYCHIA MONTAGNEI*.**

Fração	Eluente	Rendimento (%) <sup>a</sup>	Carboidrato <sup>b</sup>	Sulfato <sup>c</sup>	Proteína
			(% anidro)	(% SO <sub>3</sub> Na)	(%) <sup>d</sup>
B-H <sub>2</sub> O	água	18,8 (24,6)	60,0	13,0	0
B-0,75	NaCl 0,75M	0,7 (0,9)	37,0	11,2	0
B-1,0	NaCl 1,0M	2,3 (2,9)	38,1	16,2	0
B-1,25	NaCl 1,25M	20,3 (26,5)	56,8	22,0	0
B-1,5	NaCl 1,5M	13,7 (17,9)	62,6	24,0	0
B-4,0M	NaCl 4,0M	5,7 (7,4)	46,7	22,0	2,1
B-uréia	Uréia 6,0M	1,4 (1,9)	53,5	10,1	5,2
B-NaOH	NaOH 0,5M	13,7 (17,9)	43,4	18,1	5,3

a = entre parênteses porcentagem em relação ao recuperado.

b, c, d = determinado pelos métodos: Fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al, 1956), DOGSON (1961) e LOWRY et al. (1951), respectivamente.

**TABELA 4. COMPOSIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE *BOSTRYCHIA MONTAGNEI*.**

Fração	Gal <sup>b</sup>	3,6-AG	Monossacarídeos <sup>a</sup> (moles %)							NaSO <sub>3</sub> <sup>c</sup>
			2-Me-3,6-AG	6-Me	2-MeG	Xil	Glc	Man	Sulfato	
B-água	57,2	10,1	3,9	5,1	0,2	4,9	2,0	----	16,7	
B-0,75	48,5	3,0	1,3	3,5	0,1	17,5	8,6	3,0	14,5	
B-1,0	55,4	4,1	9,3	6,4	0,7	2,6	1,4	----	20,1	
B-1,25	52,3	8,9	5,7	4,9	0,6	2,1	----	----	25,5	
B-1,5	55,5	8,4	2,2	4,1	0,8	1,8	----	----	27,2	
B-4,0	56,9	7,9	1,9	4,0	----	3,9	----	----	25,4	
B-uréia	45,2	5,7	1,2	2,5	1,2	36,1	----	----	14,6	
B-NaOH	5,3	0,6	0,3	0,1	----	31,6	30,3	10,9	20,9	
B-CW	54,3	7,5	2,2	4,8	0,1	2,7	2,1	----	26,3	

a = Determinado por análise de C.G-E.M. na forma de acetato de alditol, utilizando prévia hidrólise redutiva (STEVENSON & FURNEAUX, 1991).

b = Gal, 3,6-AG, 2-Me-3,6-AG, 6-MeG, 2-MeG, Xil, Man e Glc referem-se a: galactose 3,6-anidrogalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 6-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, xilose, manose e glucose, respectivamente.

c = traços (tr.= menor que 0,2%).

d = não detectado.

e = determinado pelo método de DOGSON (1961).

**TABELA 5. ANÁLISE DAS FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA A PARTIR DO EXTRATO PURIFICADO B-CW DE *BOSTRYCHIA MONTAGNEI*.**

Fração	GP <sup>a</sup>	[ $\alpha$ ]D <sup>b</sup>	Relação molar	
			sulfato/ac. Total <sup>c</sup>	
<b>B-H<sub>2</sub>O</b>	31.300	-51,0	0,20	
<b>B-0,75</b>	5.600	nd <sup>d</sup>	0,17	
<b>B-1,0</b>	11.900	-26,0	0,25	
<b>B-1,25</b>	43.700	-43,9	0,34	
<b>B-1,5</b>	42.500	-42,4	0,37	
<b>B-4,0M</b>	34.000	-44,8	0,20	
<b>B-uréia</b>	7.000	+75,5	0,17	
<b>B-NaOH</b>	8.300	+30,7	0,26	

a = Grau de polimerização, determinado pelo método de PARK & JOHNSON (1949).

b = a rotação ótica foi determinada em água com as frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g%

c = calculado apartir dos valores da Tabela 4

d = não determinado

Todas as frações de galactanas sulfatadas, B-água, B-1,0 a B-4,0 apresentam valor de rotação ótica específica negativa (-26,0 a -51,0), TABELA 5, demonstrando a presença de isômero L- da galactose e portanto, indicando que as galactanas biossintetizadas por *Bostrychia montagnei* são do tipo ágar.

As frações B-uréia e B-NaOH diferenciam-se das demais, obtidas por eluição com água ou NaCl. B-uréia e B-NaOH apresentam alto teor de xilose, sendo constituídas por: galactose (38,7% moles%), 3,6-anidrogalactose (5,7% moles%), 2-O-metil-3,6-anidrogalactose (1,2 moles%), 6-O-metilgaiactose (2,5 moles%), 2-O-metilgalactose (1,2 moles%) e galactose (5,3 moles%), 3,6-anidrogalactose (0,6 moles%), 2-O-metil-3,6-anidrogalactose (0,3 moles%), 6-O-metilgaiactose (0,1 moles%), glucose (31,6 moles%) e manose (10,9 moies%) respectivamente. O alto teor de glucose em B-NaOH provavelmente deve-se a contaminação por florideana. Somente após a purificação da fração B-NaOH será possível para estabelecer sua real composição, uma xilana e ou xilomanana, já que o teor de manose também é elevado.

Estas frações caracterizam-se por apresentar baixo grau de polimerização (GP de 7.000 em B-uréia e de 8.300 em B-NaOH) além de, rotação ótica específica positiva (+75,5 e +30,7, respectivamente), TABELA 5.

A xilose ocorre em polissacarídeos de algas, principalmente como xilana, ou na forma de heteropolissacarídeos, onde estão presentes dois tipos de ligação glicosídica : tipo  $\beta$  1 $\rightarrow$  3 e  $\beta$  1 $\rightarrow$  4, ou ainda como polímeros lineares de xilose em ligação glicosídica do tipo  $\beta$  1 $\rightarrow$  3 ou do tipo  $\beta$  1 $\rightarrow$  4. Enquanto as primeiras são solúveis em água (diferentes das xilananas de plantas terrestres) as outras, presentes na parede celular, são polissacarídeos álcali-solúveis (TURVEY & WILLIAN, 1970).

Da Rhodophyta *Nosthogenia fastigiata* (ordem Nemaliales) foram isoladas homoxilananas (CEREZO, et al., 1971) e uma família de mananas

sulfatadas [( $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$  3)] contendo xilose em C-2 (MATULEWICZ & CEREZO, 1987) além de, uma família de gaiactanas sulfatadas complexas, contendo xilose, manose e galactose (HAINES, et al., 1990). Portanto, embora não investigado no presente trabalho, não podemos excluir a presença destes polissacarídeos na fração B-NaOH.

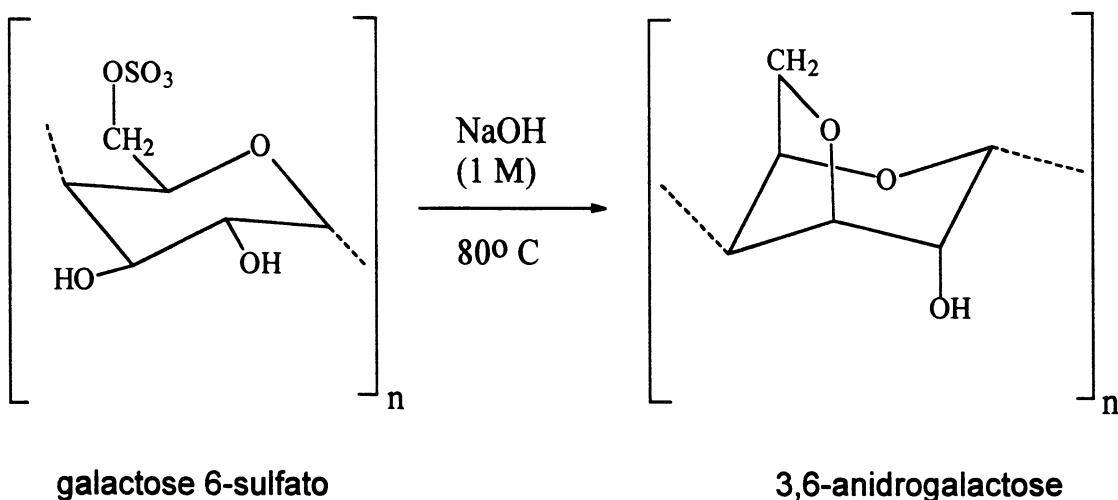
Até o presente, na ordem Ceramiales, a xilogalactana com maior teor de xilose (14,0 moles%) foi isolada da alga *Condria macrocarpa* (FURNEAUX & STEVENSON, 1990), onde as unidades de xilose estão em C-3 da unidade B. Portanto, nesta ordem, ainda não foi relatado a presença de polímeros de xilose (homo ou heteroxilananas).

Deste modo, observa-se que os polissacarídeos de *Bostrychia montagnei*, solúveis em água a 25°C, são majoritariamente gaiactanas sulfatadas do tipo ágar. No entanto, de acordo com a composição das frações B-uréia e B-NaOH, provavelmente também estão presentes outros tipos de polissacarídeos como por exemplo, xilananas (homo ou heteroxilananas).

A presença de galactose 6-sulfato, nas gaiactanas B-1,25 e B-1,5, foi investigada através do tratamento alcalino. Em meio alcalino as unidades de galactose-6 sulfato, contendo grupos hidroxila livres em C-3, são convertidas em 3,6-anidrogalactose (Unidade B), FIGURA 10. Embora semelhantes em termos de composição monossacarídica e em grau de polimerização (GP = 43.000 e 42.500, respectivamente), apenas a fração B-1,5 apresentou uma pequena modificação na sua composição após este tratamento. O teor de 3,6-anidrogalactose aumentou de 11,6 para 15,5 moles%, com uma concomitante diminuição do teor de galactose (76,2 para 70,7 moles%), TABELA 6. Por estes resultados é possível concluir que a fração B-1,5

diferencia-se da fração B-1,25 por apresentar galactose 6-sulfato labil a álcali, embora em baixa porcentagem.

**FIGURA 10. REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO: TRANSFORMAÇÃO DAS UNIDADES DE GALACTOSE 6-SULFATO EM 3,6-ANIDROGALACTOSE, EM MEIO ALCALINO.**



Esta reação de ciclização tem interesse sob o aspecto do estudo estrutural bem como, na área industrial. A formação de 3,6-anidrogalactose durante a reação em meio básico ocasiona aumento no poder de geleificação devido a capacidade do polissacarídeo em adquirir a conformação helicoidal. Esta fato é explicado pela capacidade do polímero em formar hélices duplas, as quais se unem em agregados que podem conter  $10-10^4$  hélices. (ARNOTT et al., 1974).

**TABELA 6. COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES B-1,25 E B-1,5 ANTES E APÓS TRATAMENTO ALCALINO.**

Fração	Gal <sup>b</sup>	Monossacarídeos <sup>a</sup> (moles %)				
		3,6-AG	2-Me-3,6-AG	6-Me	2-Me	Xil
B-1,25	70,2	11,9	7,6	6,4	0,8	3,1
B-1,25-T <sup>c</sup>	70,2	11,9	7,6	6,4	0,8	3,1
B-1,5	76,2	11,6	3,0	5,6	1,1	2,5
B-1,5-T <sup>d</sup>	70,7	15,5	4,0	5,3	0,8	3,7

<sup>a</sup> = Determinado por análise de C.G-E.M. na forma de acetato de alditol, utilizando prévia hidrólise redutiva (STEVENSON & FURNEAUX, 1991).

<sup>b</sup> = Gal, 3,6 AG, 2-Me-3,6-AG, 6-MeG, 2-MeG, Xil referem-se a: galactose 3,6-anidrogalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 6-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, xilose, respectivamente.

<sup>c</sup> e <sup>d</sup> = Referem-se as frações B-1,25 e B-1,5 após tratamento alcalino, respectivamente.

As galactanas de algas vermelhas podem apresentar diferentes unidades de galactose O-metiladas. As mais freqüentes são 6-O-metil-D-galactose, em ágares e porfiranas, e 2-O-metilgalactose (BOWKER & TURVEY, 1968). A primeira é encontrada nas unidades A da cadeia polissacarídica, ao invés da unidade de galactose, enquanto que 2-O-metilgalactose está na unidade B. Adicionalmente, parte das unidades de 3,6-anidrogalactose podem estar 2-O-metiladas.

A análise conjunta da composição em monossacarídeos e de metilação fornece informações estruturais importantes. No entanto, a presença de grupos metil, que ocorrem naturalmente nas unidades de

galactose, é “mascarada” durante a análise de metilação, impedindo diferenciá-los dos derivados metilados.

Como as gaiactanas de *B. montagnei*, B-1,25 e B-1,5, contêm as unidades metiladas mencionadas anteriormente, a metilação destas frações foi realizada com iodeto de metila trideuterado ( $ICD_3$ ). Desta forma, os derivados naturalmente metilados podem ser diferenciados quando submetidos a análise por espectrometria de massa (TABELA 7). Por exemplo, na galactana B-1,25 o derivado 2,4,6 metilado (proveniente da unidade A, 3-O-substiúida) fornece os fragmentos de m/e 107, 167 e 48, provenientes do derivado 2,4,6 trideutério metilado. Enquanto que, os fragmentos de m/e 104, 164 e 45 são provenientes da 2,4 trideutériometilação das unidades 6-O-metiladas naturais. A quantidade destes fragmentos foi de 14,85% (107 m/e), 4,99% (167 m/e), 9,16% (48 m/e) e 19,49% (104 m/e), 5,80% (164 m/e) e 9,28% (45 m/e).

Deste modo, dos 16,7% de galactose 2,4,6 metiladas encontrados na fração B-1,25, 8,4 - 9,0% são 6-O-metiladas naturalmente. Estes dados estão de acordo com a porcentagem (7,2%) de 6-O-metilgalactose, observada na análise da composição monossacarídica (TABELA 4). Portanto, é correto assumir que toda substituição por grupos O-metil na posição C-6, ocorre nas unidades de galactose 3-O-substiúidas (unidade A).

De modo semelhante à trideutério metilação, a análise por G.C-E.M. demonstrou que, dos 13,5% do derivado de 3,6-anidrogalactose-2-O-metilado, apenas 7,9% são naturalmente metilados. Este valor está próximo ao encontrado na análise da composição em monossacarídeos neutros de B-1,25 (7,5%), (TABELA 4).

Resultados semelhantes foram obtidos com a fração B-1,5, ou seja, as porcentagens calculadas para os produtos de hidrólise do polissacarídeo metilado, foram próximas as porcentagens observadas na análise da composição em monossacarídeos neutros do polímero original.

As frações B-1,25 e B-1,5 foram submetidas a 3 séries de metilações, sendo que, em cada uma foram realizadas 3 etapas de metilação (método de Ciucanu), totalizando 9 metilações. A porcentagem de mono, di e trimetilados permaneceu aproximadamente constante após a 2<sup>a</sup> e a 3<sup>a</sup> série, para ambas as frações, o que indica que provavelmente a metilação foi completada já na 2<sup>a</sup> série.

Partindo deste princípio e assumindo que: 1) a cadeia principal é formada por igual número de unidades D- e L-, 2) que os primeiros três componentes da TABELA 7 são derivados das unidades A, 3) o derivado 2,6-di-O-metil galactose é originado tanto das unidades A (13,7% em B-1,25 e 12,0% em B-1,5) como das unidades B (13,4% em B-1,25 e 17,9% em B-1,5), os oito derivados seguintes (TABELA 7) são originados das unidades B, 4) a soma das porcentagens dos derivados metilados provenientes da unidade A foi considerada como 100%, assim como da unidade B, observa-se que: em B-1,25 aproximadamente 35% das unidades A são substituídas em C-6 (seja por grupos metil, 8,0%, ou grupos O-sulfato, 27%). Estas unidades, na galactana B-1,5, estão relativamente mais substituídas, aproximadamente 55,0%, (sendo 12% por grupos metil e 43% por grupos sulfato). O restante das unidades A, (8% em B-1,25) e (12% em B-1,5) são β-D-galactose não substituída por grupos sulfato.

**TABELA 7. RESULTADO DAS ANÁLISES DE METILLAÇÃO DAS FRAÇÕES B-1,25 E B-1,5 DE *B. MONTAGNEI*.**

Derivado metilado <sup>a</sup>	% de monossacarídeo	
	Fração B-1,25	Fração B-1,5
2,4,6-Gal	16,7	11,7
2,4-Gal	12,7	20,8
4,6-Gal	4,7	3,3
2,6-Gal	27,2	30,5
2-Me-3,6-AGal	13,5	10,1
3,6-Agal	3,7	2,3
2-Gal	4,4	7,4
3-Gal <sup>b</sup>	1,0	2,1
2,3-Gal	1,1	1,0
3,6-Gal	4,5	0
6-Gal	6,1	7,0
2,3,6-Gal	0,6	0,7
2,3,4,6-Gal	0,8	1,0
2,3,4-Xil	2,0	1,1
Galactose	1,1	1,0

<sup>a</sup>= 2,4,6-Gal, refere-se a 2,4,6-tri-O-metilgalactitol, etc.

2-Me-3,6Agal, refere-se a 2-O-metil-3,6-anidrogalactitol, 3,6-Agal, refere-se a 3,6 anidrogalactitol.

<sup>b</sup>= Diferenciada do enantiômero 4-Gal por meio de marcação com deutério ( $\text{NaDH}_4$ ).

$\beta$ -D-galactose 2-sulfato e 4-sulfato são observadas em porcentagens semelhantes, em ambas as gaiactanas (10 e 29% em B-1,25 e 12 e 25% em B-1,5). As unidades B, das gaiactanas B-1,25 e B-1,5, são constituídas principalmente por 3,6-anidrogalactose (3,6-anidrogalactose + 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 36% e 26%, respectivamente) e por  $\alpha$ -galactose-3-sulfato (28% e 37%, respectivamente). A soma de 3-metilgalactose e 2,3-metilgalactose, possíveis unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose, foi de 2,1% e 3,1% nos produtos de metilação de B-1,25 e B-1,5, respectivamente, TABELA 7.

Ressalta-se que, a metilação foi conduzida no polímero original, isto é, sem dessulfatar. Portanto, a identidade dos substituintes em C-6 (sulfato ou monossacarídeo) só poderá ser elucidada após a metilação do polímero dessulfatado.

Pelos resultados obtidos no tratamento alcalino é possível sugerir que, em B-1,5, os substituintes em C-6 são grupos O-sulfato, enquanto que, em B-1,25 existe outro tipo de substituinte (xilose e ou galactose), já que, a fração B-1,25, não apresentou aumento no teor de 3,6-anidrogalactose após tratamento alcalino.

Os monometilados, 2-O-metilgalactose e 6-O-metilgalactose, detectados como derivados trideutério metilados, (portanto não são observados no polissacarídeo original) podem ser provenientes tanto da unidade A, 3-O-substituída, como da unidade B, 4-O-substituída. No entanto, para a execução dos cálculos foram considerados como unicamente nas unidades B.

Portanto, pelos resultados de metilação dos polímeros originais, podemos sugerir que a galactana B-1,5 apresenta maior porcentagem de  $\beta$ -D-galactose 6-sulfato e  $\alpha$ -L-galactose 3-sulfato do que B-1,25. Galactose 3-sulfato substituída glicosidicamente em C-4 (unidade B) tem sido detectada apenas no polissacrídeo híbrido ágar-carragenana, isolado de *Anatheca dentata* (Solieriaceae, Gigartinales) (NUNN et al., 1971 e 1981), não sendo um derivado observado em carragenanas típicas ou em galactanas do tipo agaróide. Outro substituinte, em termos quantitativos, que diferencia estas galactanas é o grupo O-metil, nas unidades 3,6-anidrogalactose (em B-1,25 o teor de 2-O-metil 3,6-anidrogalactose é 2,6 vezes maior que em B-1,5).

Portanto, em relação aos grupos substituintes, observa-se que sulfato em C-6 e C-3 predominam em B-1,5 e os grupos O-metil (C-2 das unidades de 3,6-anidrogalactose) em B-1,25.

Como comentado anteriormente, parte do derivado metilado 2,6-metil-galactose (TABELA 7) é proveniente das unidades A, o que implica na presença de  $\beta$ -galactose 4-sulfato em ambas galactanas. Esta hexose sulfatada é um dos constituintes (unidade A) de carragenanas do tipo *kappa*. Ressalta-se ainda que, além deste derivado, nas galactanas de *B. montagnei*, foram observadas tanto por análise de composição monosacarídica, de metilação assim como, por R.M.N.-  $^{13}\text{C}$ , unidades freqüentemente presentes em polissacarídeos do tipo ágar (3,6-anidro-L-galactose, D-galactose 6-sulfato, entre outras). Os derivados 2,3,4-tri-O-metilxilose e 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactose foram observados em baixa porcentagem, indicando que as unidades de xilose e galactose estão presentes como grupos terminais não redutores.

Os espectros de R.M.N.-<sup>13</sup>C das galactanas B-1,25 e B-1,5 estão nas FIGURAS 13 e 14. Comparando-se estes espectros com o da fração original B-CW, FIGURA 7, observam-se os mesmos grupos de sinais, distinguem-se nove sinais na região anomérica porém, melhor definidos. Para a atribuição dos sinais, nos referidos espectros, foram realizadas análises de R.M.N.-<sup>13</sup>C de gaiactanas sulfatadas disponíveis em nosso laboratório: *Hypnea musciformis* e *Porphyra columbina* (FIGURAS 11 e 12).

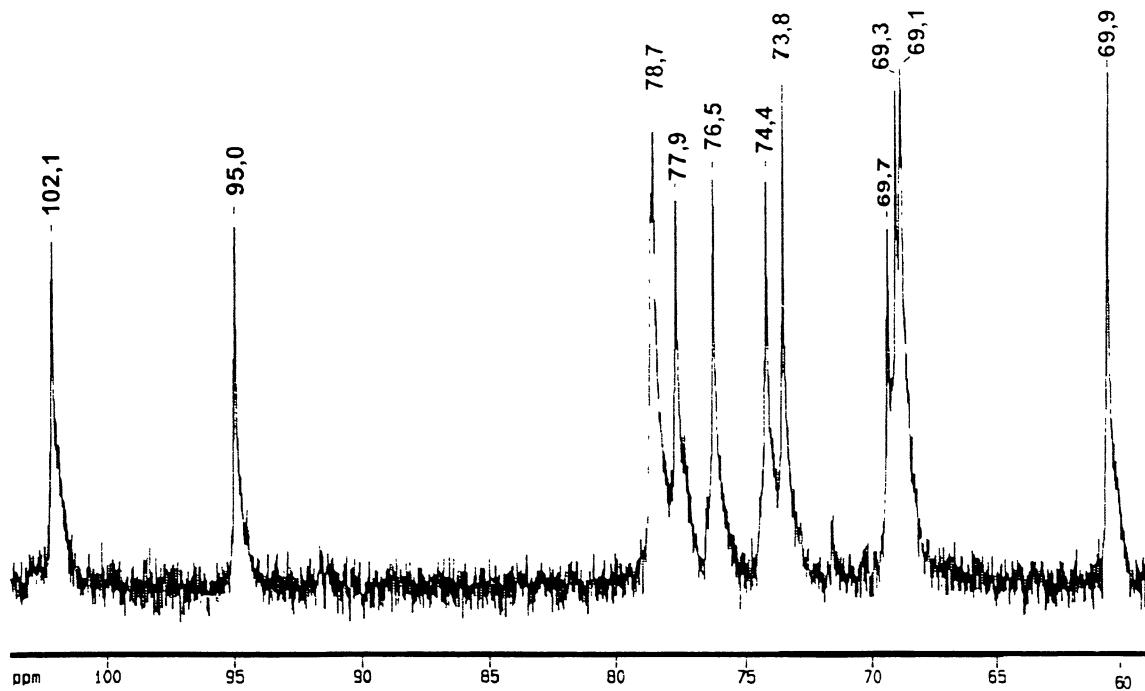
O polissacarídeo de *H. musciformis* é uma kappa-carragenana, com estrutura repetitiva de  $\beta$ -D-galactopiranose 4-sulfato e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranose. Da alga *P. columbina*, isolou-se uma galactana constituída principalmente pelas unidades repetitivas 6-O-metil-D-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose. Aliando os dados de análise de R.M.N.-<sup>13</sup>C, destas e de outras gaiactanas, onde é verificado o efeito dos grupos O-sulfato e O-metil nos deslocamento químicos dos carbonos aos quais estes grupos se ligam (USOV et al., 1983 e STORTZ & CEREZO, 1992), foi possível atribuir alguns sinais, principalmente na região anomérica e de carbonos primários (TABELA 8).

Os sinais observados na região anomérica podem ser divididos em dois grupos: um entre 103,9 -102,3 ppm, correspondendo as unidades  $\beta$ -D-galactopiranose (Unidades A) e outro entre 100,4 - 96,3 ppm referentes as unidades de  $\alpha$ -L-galactopiranose e 3,6-anidrogalactopiranose (Unidades B).

De maneira estimativa, a integração das áreas referentes aos dois grupos de sinais forneceu um valor de aproximadamente 1:1, indicando que

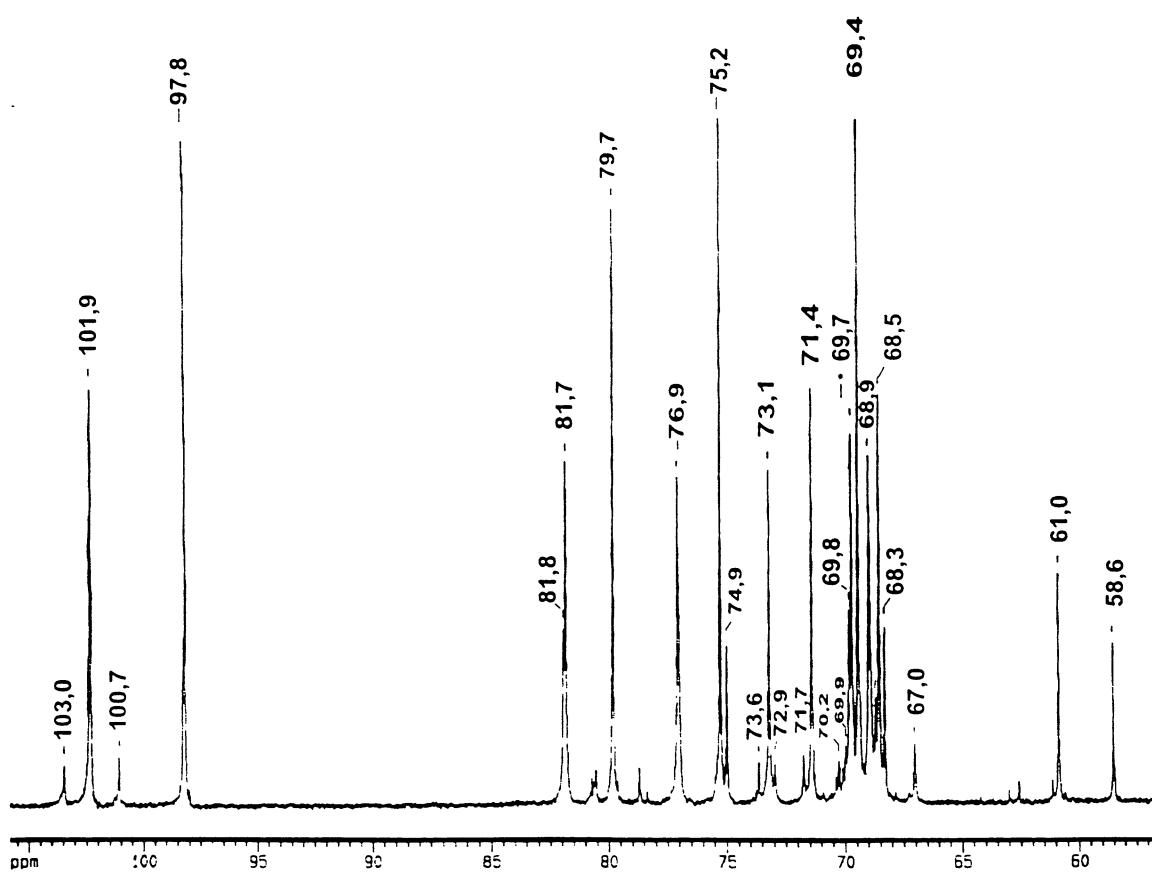
estas galactanas apresentam estrutura alternada de unidades  $\beta$ -D-galactopiranose e  $\alpha$ -L-galactopiranose, característica do tipo ágar.

**FIGURA 11. ESPECTRO DE R.M.N.- $^{13}\text{C}$  DA GALACTANA (KAPPA-CARRAGENANA) ISOLADA DA RHODOPHYTA *Hypnea musciformis*.<sup>1</sup>**



1. Análise realizada a 70°C, em D<sub>2</sub>O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 20 mg/ml.

**FIGURA 12. ESPECTRO DE R.M.N.-<sup>13</sup>C DA GALACTANA (porfirana)  
ISOLADA DA RHODOPHYTA *Porphyra columbina*.<sup>1</sup>**



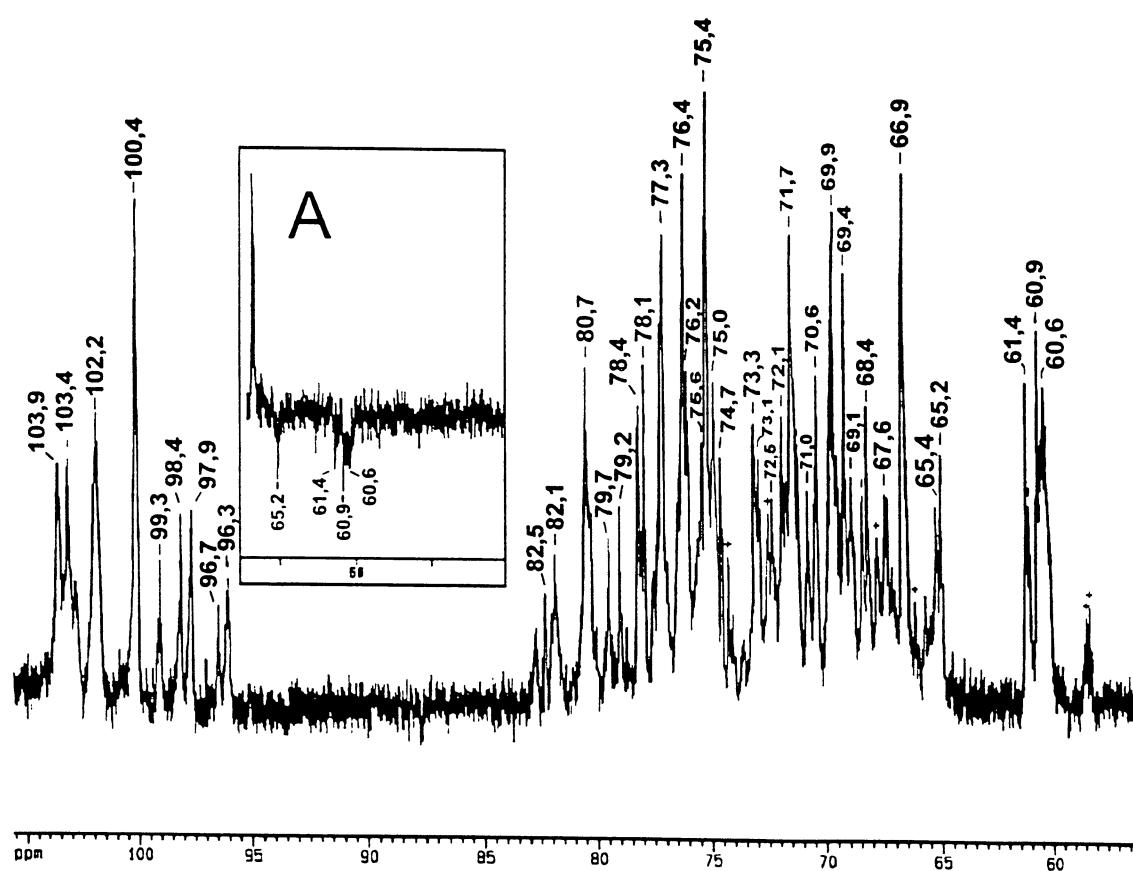
1. Análise realizada a 70°C, em D<sub>2</sub>O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 20 mg/ml.

**TABELA 8. DESLOCAMENTO QUÍMICO DOS SINAIS DOS CARBONOS ANOMÉRICOS E PRIMÁRIOS NO ESPECTRO DE R.M.N.-<sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES B-1,25 E B-1,5 DE *B. MONTAGNEI*.**

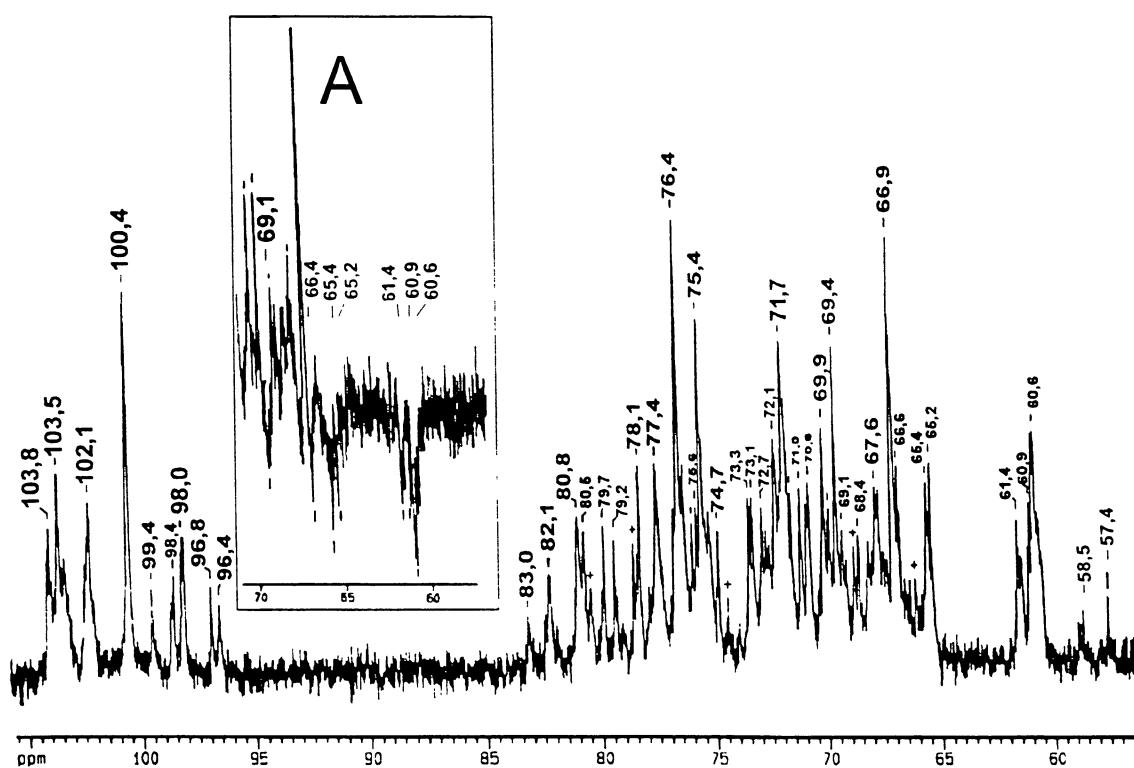
<b>C1 (ppm)</b>	<b>Atribuição do sinal</b>	<b>ligado a</b>
103,9	β-Galp (6-Me,6-S)	α-L-Galp (S, Me)
102,1-102,3	β-Galp (4-S, 6-Me,6-S)	3,6-An-α-L-Galp
100,4	α-L-Galp	β-Galp <sup>a</sup>
99,3	α-L-Galp (2-S, 2-Me)	β-Galp <sup>a</sup>
98,4	3,6-An-α-L-Galp	β-Galp 4-S
97,9	3,6-An-α-L-Galp	β-Galp <sup>a</sup>
96,7	2-Me-3,6-An-α-L-Galp	β-Galp <sup>a</sup>
96,3	2-Me-3,6-An-α-L-Galp	-----
<b>C-6 (ppm)</b>	<b>Atribuição do sinal</b>	<b>-----</b>
60,6-61,4	β-Galp, α-Galp	-----
65,2-66,6	β-Galp 6-S, α-Galp 6-S	-----
69,1	3,6-An-α-L-Galp	-----
71,4	6-O-Me β-Galp	-----

<sup>a</sup>= corresponde aos substituintes 2-S e ou 6-S e 6-Me.

**FIGURA 13. ESPECTRO DE R.M.N.-<sup>13</sup>C DA GALACTANA B-1,25 ISOLADA DA RHODOPHYTA *B. montagnei*.<sup>1</sup>**



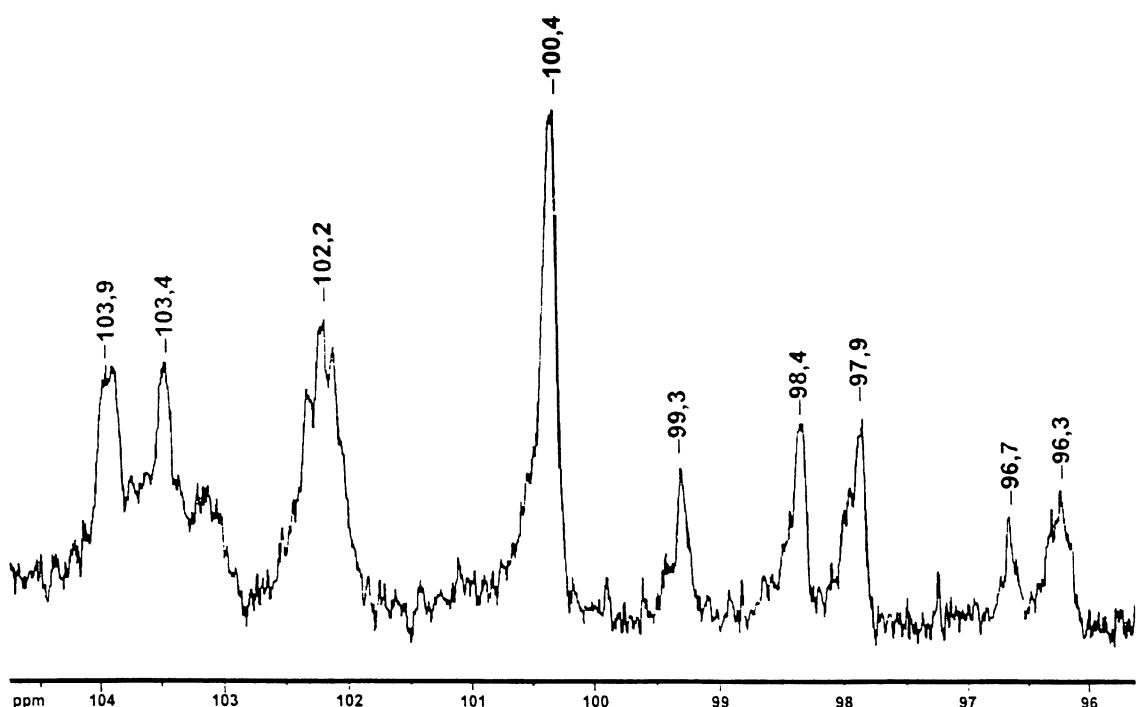
**FIGURA 14. ESPECTRO DE R.M.N.-<sup>13</sup>C DA GALACTANA B-1,5 ISOLADA DA RHODOPHYTA *B. montagnei*.<sup>1</sup>**



1. Análise realizada a 70°C, em D<sub>2</sub>O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 20 mg/ml.

A: refere-se ao R.M.N.-<sup>13</sup>C DEPT evidenciando os sinais negativos de CH<sub>2</sub>, correspondentes ao C-6 da fração B-1,5.

**FIGURA 15. ESPECTRO DE R.M.N.-<sup>13</sup>C DA REGIÃO DE CARBONOS ANOMÉRICOS DA GALACTANA B-1,25 ISOLADA DA RHODOPHYTA *B. montagnei*.<sup>1</sup>**



1. Análise realizada a 70°C, em D<sub>2</sub>O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 20 mg/ml.

O sinal de 103,9 ppm (FIGURAS 13 e 14) foi atribuído ao C-1 das unidades de  $\beta$ -galactopiranose, apresentando C-6 livre ou substituído por grupos O-sulfato ou O-metil, ligadas a  $\alpha$ -L-galactopiranose (podendo esta última unidade estar sulfatada ou metilada). O efeito ocasionado pelas

diferentes diádes possíveis é melhor visualizado após a ampliação da região anomérica (FIGURA 15).

O sinal em 102,1-102,3 ppm corresponde ao C-1 das unidades de  $\beta$ -galactopiranose, que pode estar substituída por grupos sulfato e ou metil em C-4 e C-6, respectivamente, ligadas a 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranose (FIGURA 15). Na região anomérica correspondente às unidades de  $\alpha$ -L-galactopiranose, podemos considerar os sinais entre 100,4-99,3 ppm e os entre 98,4-96,3 ppm. O primeiro grupo de sinais corresponde a  $\alpha$ -L-galactopiranose (100,4 ppm) e a  $\alpha$ -L-galactopiranose sulfatada e ou metilada em C-2 (99,3 ppm). No segundo grupo, estão presentes os sinais referentes às unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranose. O sinal em 98,4 ppm corresponde ao C-1 da referida unidade, ligada à  $\beta$ -galactopiranose 4-sulfato e o em 97,9 ppm ao C-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranose ligadas à  $\beta$ -galactopiranose (podendo estar sulfatada e ou metilada em C-2 ou C-6). Os sinais em 96,7 e 96,3 ppm correspondem ao C-1 das unidades de 2-O-metil 3,6-anidrogalactose.

A ausência de sinal em 95,0 ppm, o qual é observado no espectro de kappa-carragenana, FIGURA 11, relativo as unidades de 3,6-anidro-D-galactopiranose, demonstra que todas as unidades de 3,6-anidrogalactopiranose, em B-1,25 e B-1,5, pertencem a série L-. Estes resultados estão de acordo com o valor negativo de rotação ótica específica obtido para estas galactanas (TABELA 5), que indica a presença do isômero L- da galactose.

A presença de grupos O-metil, em C-6 das unidades de  $\beta$ -D-galactopiranose e em C-2 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranose, é confirmada pelos sinais em 58,5-58,7 ppm, de baixa intensidade, nos espectros de B-1,25 e B-1,5 (FIGURAS 13 e 14).

Outros dados estruturais foram obtidos através do experimento de R.M.N.- $^{13}\text{C}$ -DEPT, no qual a sequência de pulsos determina a inversão dos sinais de  $\text{CH}_2$ . Os sinais invertidos entre 60,6-61,4 ppm correspondem ao C-6 de unidades de galactopiranose não substituída ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ). Também estão invertidos os sinais entre 65,1 e 66,6 ppm, correspondentes ao C-6 substituído por grupos sulfato ( $\text{CH}_2\text{OSO}_3$ , galactopiranose 6-sulfato). O sinal em 69,1 ppm, correspondente ao C-6 das unidades de 3,6-anidro-L-galactopiranose, foi invertido, embora essa inversão não esteja tão evidente como nos anteriores porque encontra-se em uma região com grande número de sinais (FIGURAS 13A e 14 A).

O espectro de R.M.N.- $^{13}\text{C}$  da fração B-1,5 (FIGURA 14) apresenta os mesmos sinais de B-1,25 (FIGURA 13) porém, com intensidade diferente. Por exemplo, em B-1,5 o sinal em 103,4 ppm é de maior intensidade do que em 103,9 ppm, enquanto que, em B-1,25 estes são de intensidade semelhante. A integração semiquantitativa dos sinais referentes a galactopiranose 6-sulfato e a galactopiranose demonstrou uma relação maior (1:2) para a galactana B-1,25 do que para a B-1,5 (1:1). Deste modo, a fração B-1,5 apresenta proporcionalmente, maior porcentagem de grupos sulfato em C-6 do que a B-1,25. Estes resultados confirmam os dados de metilação.

Salientamos que, embora a análise por R.M.N.-<sup>13</sup>C não possa ser utilizada de maneira quantitativa, as diferenças na intensidade dos sinais das galactanas de *B. montagnei* estão de acordo com as diferenças observadas nas análises químicas, de metilação e de composição monossacarídica.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as galactanas B-1,25 e B-1,5 de *B. montagnei* apresentam uma estrutura básica repetitiva constituída por: β-D-galactopiranose 3-O-substituída e α-L-galactopiranose 4-O-substituída, a qual é modificada em diferentes graus por grupos O-metil e O-sulfato.

Recentemente uma série de polissacarídeos têm sido alvo de pesquisas como uma importante classe de produtos naturais bioativos. (FRANZ & ALBAN, 1995). Neste aspecto podemos destacar os polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas os quais, podem apresentar atividades biológicas distintas. Dentre elas, podemos citar a atividade anticoagulante observada em fucanas sulfatadas obtidas de *Ectonia kurome* (NISHINO et al., 1989; NISHINO & NAGUMO, 1991), a atividade antitumoral de fucanas sulfatadas (ITO et al., 1993) e de galactanas sulfatadas (FERNÁNDEZ, et al., 1989) e a atividade antiviral (KOLENDER, et al., 1997; PUJOL, et al., 1996; DAMONTE, et al., 1994).

Os polissacarídeos sulfatados de *Bostrychia montagnei* foram avaliados quanto a sua atividade anticoagulante e antiherpética. Com relação a atividade anticoagulante (TABELAS 9 e 10), observa-se que as frações polissacarídicas B-CW e B-HW assim como, as galactanas sulfatadas B-1,25 e B-1,5 apresentam baixa atividade anticoagulante tanto para o teste TT como para o APTT, quando comparadas a atividade da

heparina e de heparinóides (STUEL P, 1997; LIMA et al., 1996). Estes resultados estão de acordo com os observados para a maioria das galactanas sulfatadas (DAMONTE, et al., 1994; PUJOL, et al., 1996). Salienta-se que a baixa atividade da fração B-1,5 (25 µg/ml, teste TT e APTT) diminuiu ainda mais (4 vezes) após o tratamento alcalino. De acordo com os resultados discutidos anteriormente, esta galactana apresentou aumento do teor de 3,6-anidrogalactose, após a reação de ciclização em meio alcalino, demonstrando a perda dos grupos sulfato em C-6 contendo C-3 livre. Deste modo, podemos concluir que a presença de sulfato em C-6 é estruturalmente importante para que o polissacarídeo exerça ação anticoagulante.

Os testes de atividade antiherpética *in vitro*, método de redução do número de placas, foram realizados utilizando HSV tipo 1 e tipo 2 cepas F e G, respectivamente (TABELA 11, FIGURAS 16 e 17). A fração bruta B-HW apresenta valor de  $CI_{50}$  mais elevado para HSV-1 (F) (20,7 µg/ml) do que para HSV-2.

A galactana sulfatada B-1,5 apresentou  $CI_{50}$  com valor de 5,5 µg/ml para HSV-1(F) e 6,2 µg/ml para HSV-2 (G). As frações B-água e B-1,25 foram inativas para os dois tipos virais. Portanto, dentre as frações testadas, a galactana B-1,5 apresentou atividade antiherpética mais elevada. Os polissacarídeos de *Bostrychia montagnei* não ocasionam redução da viabilidade ( $CC_{50}$ ) das células Vero até a concentração de 1000 µg/ml (TABELA 11), demonstrando não causar toxicidade neste sistema celular.

**TABELA 9. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS FRAÇÕES DE *BOSTRYHIA MONTAGNEI* ANALISADA ATRAVÉS DO TESTE TT.**

Fração	Conc. Polis. <sup>a</sup> ( $\mu$ g/ml)	Tempo (seg.) média <sup>b</sup>	Tempo (seg.) desvio padrão
B-CW	50	23,90	1,27
B-1,25	25	24,70	1,70
B-1,5	25	24,35	0,49
B-1,5 -T <sup>c</sup>	100	24,35	0,21
B-HW	50	23,90	0,35

a = Concentração mínima da fração polissacarídica que apresentou atividade anticoagulante, quando comparada ao plasma controle (tempo = 19 segundos). De acordo com a padronização considerou-se com atividade as frações que apresentaram tempo de coagulação 5 segundos superior ao tempo controle. A Heparina padrão (150 UI/mg), nas mesmas condições do teste, apresentou tempo de coagulação maior que 100 seg. na concentração de 7  $\mu$ g/ml.

b = Média do tempo de coagulação de dois ensaios independentes, realizados em duplicata.

c = Refere-se a fração B-1,5 após tratamento alcalino.

**TABELA 10. ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS FRAÇÕES DE *BOSTRYCHIA MONTAGNEI* ANALISADAS ATRAVÉS DO TESTE APTT.**

Fração	Conc. ( $\mu$ g/ml) <sup>a</sup>	Tempo (seg.) média <sup>b</sup>	Tempo (seg.) desvio padrão
B-CW	50	48,80	0,28
B-1,25	100	44,90	0,00
B-1,5	25	47,95	0,78
B-1,5 -T <sup>c</sup>	100	55,15	3,46
B-HW	25	42,50	0,85

a = Concentração mínima da fração polissacarídica que apresentou atividade anticoagulante, quando comparada ao plasma controle (tempo = 32,8 segundos). De acordo com a padronização considerou-se com atividade as frações que apresentaram tempo de coagulação 7 segundos superior ao tempo controle. A Heparina padrão (150 UI/mg), nas mesmas condições do teste, apresentou tempo de coagulação maior que 120 seg. na concentração de 4  $\mu$ g/ml.

b = Média do tempo de coagulação de dois ensaios independentes, realizados em duplicata.

c = Refere-se a fração B-1,5 após tratamento alcalino.

**TABELA 11. ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *BOSTRYCHIA MONTAGNEI*.**

Fração	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>		$CC_{50}$ <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ )
	HSV-1	HSV-2	
B-CW	12,9	11,2	>1000
B-água	-----	-----	>1000
B-1,25	-----	-----	>1000
B-1,5	5,5	6,2	>1000
B-NaOH	12,5	12,5	>1000
B-HW	20,7	11,7	>1000

**a** = As células Vero (rim de macaco africano) foram cultivadas com Meio Mínimo Essencial (MEM) com 5% de Soro bovino fetal. As cepas virais (HSV-1 e HSV-2) foram obtidas do American Type Culture Collection (Rockville, U.S.A) e submetidas a IFI (Imunofluorescência Indireta) para caracterização como tipo 1 ou 2.

**a** = A atividade antiviral foi determinada pelo ensaio de redução do número de placas: a monocamada celular foi infectada com 100 UFP do vírus por orifício na presença e na ausência de diferentes concentrações dos polissacarídeos. Após 1 hora de incubação a 37°C, o inóculo foi substituído por MEM contendo 0,7% de metil celulose em presença dos polissacarídeos. Determinou-se o número de placas após 48 horas de incubação a 37°C em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub>. A concentração inibitória 50 ( $IC_{50}$ ) foi calculada de acordo com a concentração necessária para reduzir o número de placas virais em 50%. Os valores obtidos representam a média do experimento realizado em duplicita.

**b** = A toxicidade das frações polissacáridicas foi determinada pelo método colorimétrico do formazam (DESELBERGER, 1995), utilizando o reagente sal de tetrazolium-MTT (Azul de tiazolina-Sigma). A concentração citotóxica 50 ( $CC_{50}$ ) foi determinada como a concentração do plissacarídeo capaz de reduzir o número de células viáveis em 50%, em relação as células controle.

Como a fração B-1,5 apresentou os menores valores de  $CI_{50}$  esta galactana foi escolhida para os estudos de cinética de adsorção do HSV-2 (G) às células Vero. Verificou-se o número de partículas virais capazes de ser adsorvidas às células durante a primeira hora do experimento, na presença e na ausência da galactana. Como pode ser observado na TABELA 12, esta fração foi capaz de inibir em até 88% o número HSV-2 (G) adsorvido às células, demonstrando que a galactana B-1,5 atua na primeira fase da replicação viral (adsorção).

Embora, a maioria dos polissacarídeos sulfatados exerçam sua ação antiviral impedindo a adsorção dos vírus envelopados às células hospedeiras (WITVROUW et al., 1994), alguns destes polissacarídeos, natural ou quimicamente sulfatados, como dextrana sulfatada, heparina e carragenanas têm sido relatados como inibidores de outras fases da replicação do vírus HIV. Para verificar esta possibilidade, a atividade antiherpética dos polissacarídeos de *Bosstrichia montagnei* foi avaliada em fases distintas da replicação viral (TABELAS 13 e 14; FIGURA 18).

**TABELA 12. EFEITO DA FRAÇÃO B-1,5 SOBRE A CINÉTICA DE ADSORÇÃO DO HSV-2 ÀS CÉLULAS VERO.**

Tempo (minutos)	Vírus adsorvido <sup>a</sup> (UFP/ml)	Vírus adsorvido + B-1,5 <sup>b</sup> (UFP/ml)
0	100	85 (15) <sup>c</sup>
10	130	85 (35)
20	130	90 (31)
30	390	90 (77)
60	390	45 (88)

a = números de vírus HSV-2 (G) adsorvidos determinado em Unidades formadoras de placas (UFP/ml) pelo ensaio do número de placas.

b = fração B-1,5 na concentração de 25 µg/ml.

c = entre parênteses a porcentagem de inibição.

**TABELA 13. ATIVIDADE DAS FRAÇÕES DE *BOSTRYCHIA MONTAGNEI* SOBRE A REPLICAÇÃO DO VÍRUS HSV-1.**

Etapa da Replicação <sup>b</sup>	Número de Placas/orifício <sup>a</sup>			
	B-CW <sup>c</sup>	B-1,5	B-HW	Controle <sup>d</sup>
Adsorção	2 (98) <sup>e</sup>	49 (49)	1 (99)	95
Pós-Adsorção	19 (81)	87 (13)	30 (70)	100
Adsorção/Pós-adsorção	0 (100)	34 (66)	0 (100)	100

a = Média do número de placas em dois experimentos independentes realizados em duplicita.

b = Etapa da replicação viral na presença do polissacarídeo.

c = Corresponde a fração polissacarídica nas seguintes concentrações: B-CW e B-HW (50µg/ml) e B-1,5 (25 µg/ml).

d = HSV-1 na concentração de 100 UFP/orifício.

e = Entre parênteses a inibição viral (%)

**TABELA 14. ATIVIDADE DAS FRAÇÕES DE *BOSTRYCHIA MONTAGNEI* SOBRE A REPLICACÃO DO VÍRUS HSV-2.**

Etapa da Replicação <sup>b</sup>	Número de Placas/orifício <sup>a</sup>			
	B-CW <sup>c</sup>	B-1,5	B-HW	Controle <sup>d</sup>
Adsorção	8 (85) <sup>e</sup>	7 (87)	7 (87)	53
Pós-Adsorção	14 (78)	24 (63)	28 (57)	65
Adsorção/Pós-adsorção	1 (98)	6 (92)	2 (97)	68

a = Média do número de placas em dois experimentos independentes realizados em duplicata.

b = Etapa da replicação viral na presença do polissacarídeo.

c = Corresponde a fração polissacáridica nas seguintes concentrações: B-CW e B-HW (50 µg/ml) e B-1,5 (25 µg/ml).

d = HSV-2 na concentração de 100 UFP/orifício.

e = Entre parênteses a inibição viral (%)

Quando as frações B-CW, B-HW e B-1,5 estiveram presentes durante a fase de adsorção viral (tanto adsorção como adsorção/pós-adsorção) houve inibição da replicação dos vírus HSV-1(F) e HSV-2 (G). No entanto, quando testou-se a atividade destas frações exclusivamente na fase pós-adsorção foi também observado inibição viral. Sendo que, o HSV-1 foi mais suscetível a ação da galactana B-HW (70% de inibição) do que o HSV-2 (57% de inibição). De modo distinto, o HSV-1 (F) é menos suscetível a ação da galactana B-1,5 do que o HSV-2 (G), TABELAS 13 e 14. Resultados semelhantes foram observados em estudos com a heparina, onde o HSV-1 (cepa KOS) mostrou-se menos suscetível do que o HSV-2 (G) a inibição por este polissacarídeo (WUDUM & SPEAR, 1989), no entanto, salienta-se que

neste estudo a heparina exerceu atividade em concentrações inferiores as observadas para as frações obtidas de *B. montagnei*.

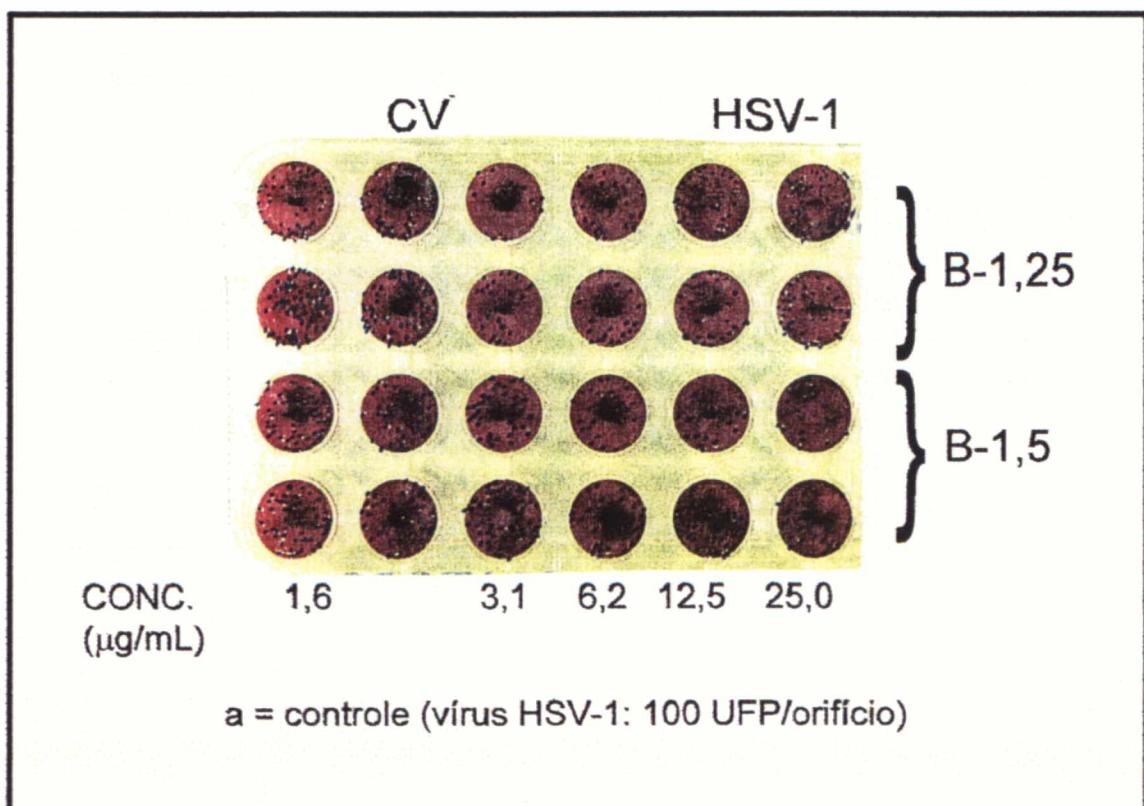
Os resultados do estudo de atividade antiherpética sugerem que os polissacarídeos de *Bostrychia montagnei* atuam na replicação viral interferindo tanto na etapa de adsorção como também em etapas posteriores a adsorção do vírus às células Vero. Salienta-se no entanto, que a ação antiherpética dos polissacarídeos sulfatados em diferentes fases da replicação não parece ser freqüente, tendo sido relatada apenas nos estudos realizados por GONZÁLEZ e colaboradores (1987). Em recentes trabalhos têm sido observado que a ação antiherpética, exercida por polissacarídeos sulfatados isolados de algas marinhas, ocorre apenas na fase de adsorção (DAMONTE, et al., 1994; PUJOL, et al., 1996; KOLENDER, et al., 1997).

A atividade antiviral de polissacarídeos de sulfatados tem sido atribuída a ligação dos polianions aos receptores virais, impedindo a adsorção do vírus aos anti-receptores celulares (WITVROUW et al., 1994). Segundo NAHMIAS (1964) e WITVROUW (1994) a ação do polissacarídeo é diretamente dependente do grau de sulfatação e do baixo grau de polimerização da molécula.

Embora o processo de adsorção do HSV à célula hospedeira não esteja totalmente esclarecido, tem sido demonstrado que a adsorção ocorre porque estes vírus se ligam ao heparan sulfato presente na superfície celular. No caso do HSV-1 sabe-se que esta interação ocorre por meio da glicoproteína gC. (WUDUNN & SPEAR, 1989; PUJOL, et al., 1996). Portanto, a ação inibitória da galactana B-1,5 sobre o HSV-1(F), durante a fase de adsorção, pode ser devido a interação deste com a glicoproteína gC. O

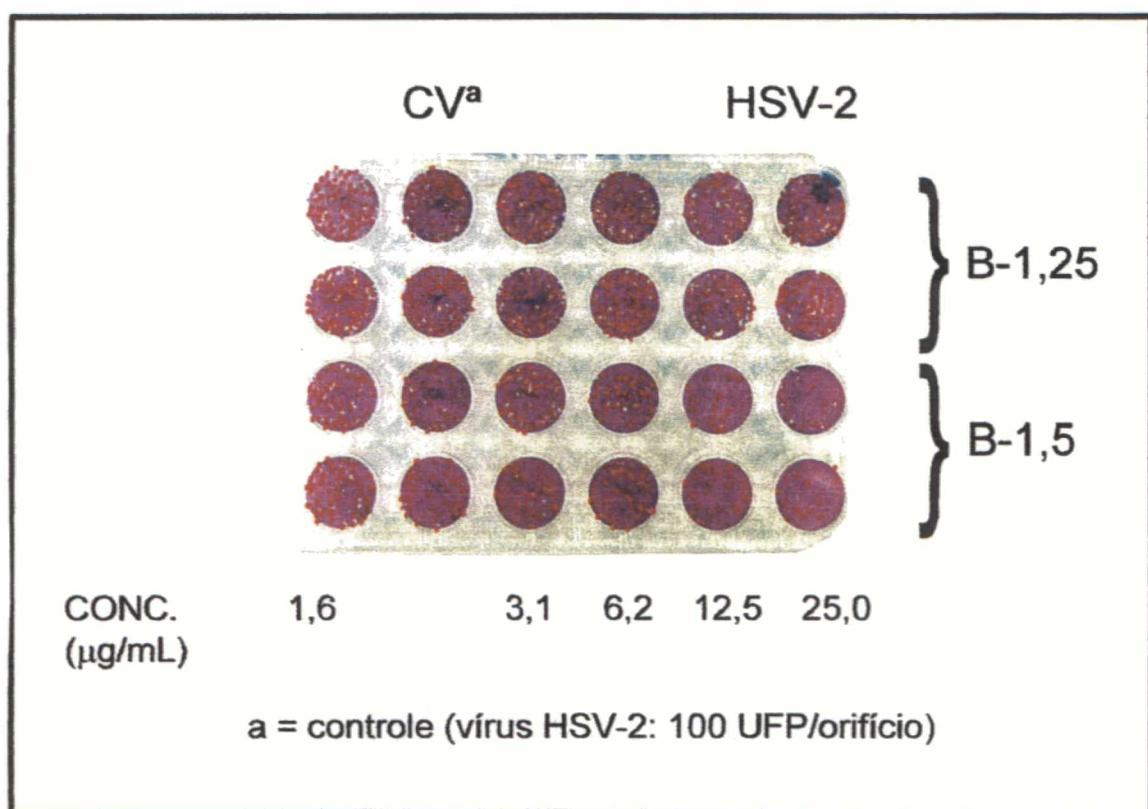
mecanismo de ação inibitória da galactana B-1,5 de *B. montagnei*, na fase pós-adsorção do HSV-2 (G) ainda precisa ser esclarecido, já que, freqüentemente observa-se que outros polissacarídeos sulfatados apenas têm ação antiherpética quando presentes na fase de adsorção.

**FIGURA 16.** ATIVIDADE <sup>1</sup> ANTI-HSV-1(F) DAS GALACTANAS B-1,25 E B-1,5 ISOLADAS DE *B. montagnei*.



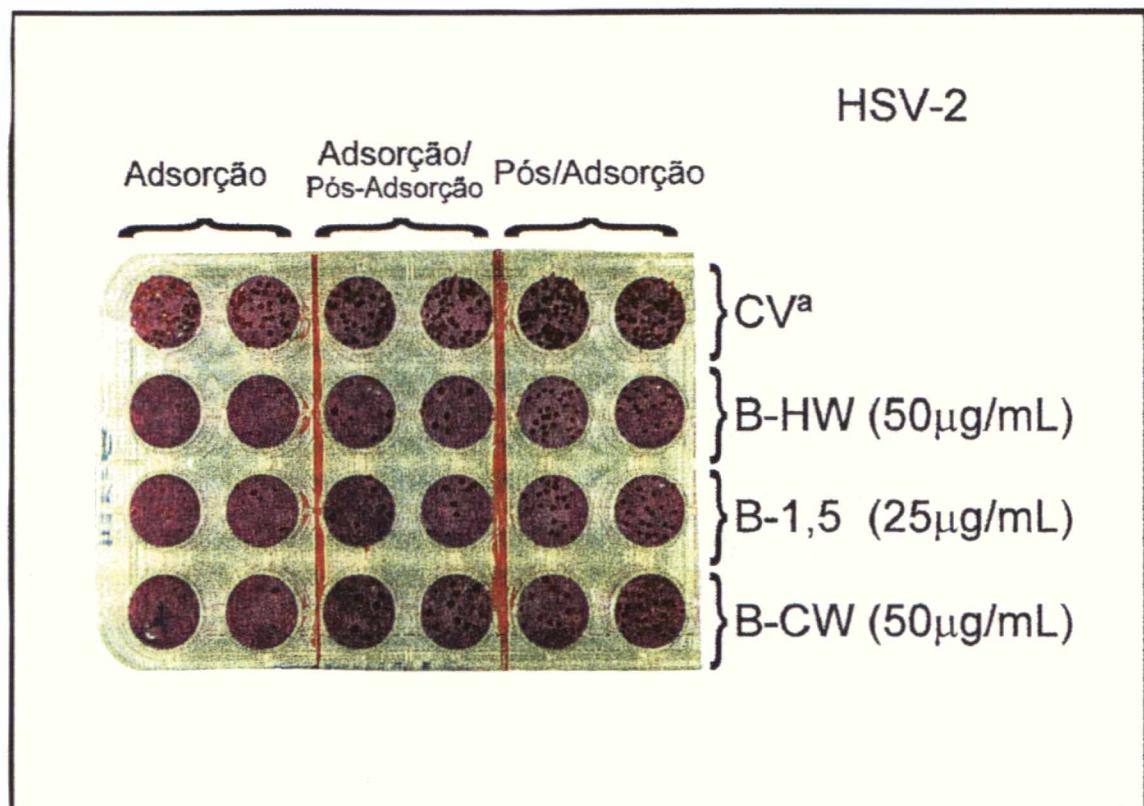
<sup>1</sup>=Ensaio de redução do número de placas. Corante: cristal violeta 1%.

**FIGURA 17. ATIVIDADE<sup>1</sup> ANTI-HSV-2 (G) DAS GALACTANAS B-1,25 E B-1,5 ISOLADAS DE *B. montagnei*.**



<sup>1</sup>=Ensaio de redução do número de placas. Corante: cristal violeta 1%.

**FIGURA 18. ATIVIDADE<sup>1</sup> DAS FRAÇÕES B-CW, B-HW B-1,5 ISOLADAS DE *B. montagnei*, SOBRE A REPLICAÇÃO DO HSV-2.**



1=Ensaio de redução do número de placas. Corante: cristal violeta 1%.

## **5 CONCLUSÕES**

---

## CONCLUSÕES

1. A alga vermelha *Bostrychia montagnei* biossintetiza galactanas sulfatadas do tipo ágar, constituídas por unidades repetitivas de  $\beta$ -D-galactopiranose 3-O-substituída e de  $\alpha$ -L-galactopiranose 4-O-substituída, as quais estão parcialmente modificadas através de substituição por grupos O-sulfato e O-metil.
2. A galactana sulfatada B-1,5 apresentou atividade antiherpética ( $IC_{50}$  5,5 e 6,2  $\mu$ g/ml para HSV-1 e HSV-2, respectivamente), inibindo a adsorção do vírus às células Vero. De modo distinto, a galactana B-1,25 não apresentou ação antiherpética até a concentração de 50  $\mu$ g/ml.
3. De acordo com a análise química estrutural comparativa e de R.M.N-  $^{13}C$ , das galactanas B-1,25 e B-1,5, a porcentagem de grupos sulfato em C-6, maior em B-1,5, das unidades de  $\beta$ -D-galactopiranose pode estar relacionada com a atividade antiherpética.

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ALLSOBROOK, A J.R; NUNN, J. R; PAROLIS, H. Sulphated polysaccharide of the *Grateloupiaceae* family. Part V. A polysaccharide from *Aeodes ulvoidea*. **Carb. Res.** v.16, p.71-78, 1971.

ARAKI, C; HIRASE, S; WATANABE, K. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXV. **Bull. Chem. Soc. Of Japan**, v.40, p.1445, 1967.

ARAKI, C & HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXI. Re-investigation of methylated agarose of *Gelidium amansii*. **Bull. Chem. Soc. Of Japan**, v.33, p.291-295, 1960.

ARNOTT, S; FULNER, A; SCOTT, W. E. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. **J. Mol. Biol.** V.90, p.269-284, 1974.

BATEY, J & TURVEY, J. R. The galactan sulphate of red alga *Polysiphonia lanosa*. **Carb. Res.** v. 43, p.133-143, 1975.

BOWKER, D.M. & TURVEY, J. R. Water soluble polysaccharides of red alga *L. pinnatifida*. Part I. Constituent units. **J. Chem. Soc.** p.983-988, 1968.

BLUMENKRANTZ, N & ASBOE-HANSEN, G. New Method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Chem.** v.54, p.484-489, 1973.

CANDEIAS, J. A N. **Laboratório de Virologia**, Edusp, p.42-46, 1996.

CEREZO, A S; LEZEROVICH, A; LABRIOLA, R & REES, D. A A xylan from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. **Carb. Res.** v.19, p.289-296, 1971.

CHIOVITTI, A; LIAO, M. L; KRAFT, G. T; MUNRO, L. A; CRAIK, D. J; BACIC, A Cell wall polysaccharides from australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Phodophyta): Highly methylated carragenans from the genus *rhabdonia*. **Botanica Marina**, v.39, p.47-59, 1996.

CHIOVITTI, A; BASIC, A; CRAICK, D. J; MUNRO, S. L. A; KRAFT, G. T; LIAO, M. Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): Novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. **Carb. Res.** v.299, p.229-243, 1997.

CHOPIN, T; HANISAK, M. D; CRAIGIE, J. S. Carrageenans from *Kallymenia westii* (Rhodophyceae) with a review of the Phycocolloids produced by Cryptonemiales. **Bot. Mar.** v.37, p.433-44, 1994.

CIUCANU, I. & KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carb. Res. Amsterdam**. v.31, p.209-17, 1984.

DAMONTE, E; NEYTS, J; PUJOL, C. A. SNOECK, R; ANDREI, G; IKEDA, S; WITVROUW, M; RUYMEN, D; HAINES, H; MATULEWICZ, M; CEREZO, A; COTTO, C; DE CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia Fastigata*. **Biochem. Pharm.** v.47, p.2187-92, 1994.

DESSELBERGER, U. Design and testing of antiviral compounds. **Medical Virology- A Pratical Approach**. p.147-171, 1995.

DOANE, W. & M; WHISTLER, R. L. Comparation of the anticoagulant activity of three polysaccharide sulfate. **Arch. Biochem. Biophys.** V.101, p.436-438, 1963.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzimic hidrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochem. J.** v.78, p.312-319, 1961.

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.350-56, 1956.

DUCKWORTH, M & YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carb. Res.** v.16, p.189-197, 1971.

EHRESMANN, D. W; DIEG, E. F; HATCH, M.T; DISALVO, L. H; VEDROS, N. A Antiviral substances from califonia marine algae. **J. Phycol.** v.13, p.37-40, 1977.

FERNÁNDEZ, L. E; VALIENTE, O. G; MAINARDI, V; BELLO, J. L. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria dominguensis*. **Carb. Res.** v.190, p.77-83, 1989.

FIELDS, B. N; KNIPE, D. M. **Virology**, Raven Press, p. 841-895, 1990.

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

FRANZ, G & ALBAN, S. Structure-activity relationship of antithrombotic polysaccharide derivatives. **Int. J. Biol. Macromol.** v.17, p.311-314, 1995.

GERBER, P; DUTCHER, J. D; ADAMS, E. V; SHERMAN, J. H. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps virus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.99, p.590, 1958.

GERESH, S; LUPESCU, N; ARAD, S. Fractionation and partial characterization of the sulphated polysaccharide of *Porphiridium*. **Phytochemistry**, v.31, p.4181-4186, 1992.

- GONZÁLEZ, M. E; ALARCÓN, B; CARRASCO, L. Polysaccharides as antiviral agents: Antiviral activity of carrageenan. **Antimicr. Agents Chem.** v.31, p.1388-1393, 1987.
- GREER, C. W. & YAPHE, W. Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatine* J. Agardh (Rhodophyta, Solariaceae) using carrageenase, infrared and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. **Bot. Mar.** v.27, p.473-478, 1984.
- HAINES, H; MATULEWICZ, M. C; CEREZO, A S. Sulfated galactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata* (Nemaliales, Rhodophyta). **Hydrob.** V.204/205, p.637-643, 1990.
- HIRASE, S; WATANABE, K; TAKANO, R; TAMURA, J. Structural features of the sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Laurencia undulata*. XI **Int. Carbohydr. Symp.** Vancouver. Canada, p.111-112, 1982. Resumo.
- ITO, H; NODA, H; AMANO, H; ZHUAUG, C; MIZUNO, T. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan prepared from *Sagassum thumbergii* of Phaeophyceae. **Anticancer Research**, v.13, p.2045-2052, 1993.
- JANSSON, P; KENNE, L; LIEDRGREN, H; LINDEBERG, B; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.** v.8, p.1-71, 1976.
- KARSTEN, U. & KIRST, G. Incomplete turgor pressure regulation in the terrestrial red alga, *Bostrichia* and *Strictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) a re-evaluation. **Br. Phycol. J.** v.25, p.363-366, 1990.
- KARSTEN, J; WEST, A; ZUCARELLO, G. Polyol content of *Bostrychia* and *Strictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from field and culture. **Bot. Marina** v.35, p.11-19, 1992.
- KIRST, G. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. **Ann. Plant Physiol.** v.41, p.21-53, 1990.
- KNUTSEN, S. H & GRASDALEN, H. Analysis of carrageenans by enzymic degradation, gel filtration and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. **Carbohydr. Polym.** v.19, p. 199-200, 1992.
- KNUTSEN, S. H; MYSLABODSKI, D. E; LARSEN, B & USOV, A I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica marina**, v.37, p.163-169, 1994.

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.

KOLENDER, A; PUJOL, C. A; DAMONTE, E; MATULEWICZ, M; CEREZO, A. The system of sulfated  $\alpha$ -(1→3)-linked D-mannans from the red seaweed *Notogentia fastigiata*: Structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carb. Res.* v.304, p.53-60, 1997.

KREMER, B. P. Distribution of alditois in the genus *Bostrychia*. *Biochem. System. and Ecol.* v.4, p.139-141, 1976.

LIMA, M. M. S; ONO, L; REICHER, F; SIERAKOWSKI, M. R. Natural and sulphated polysaccharides from Caesalpiniaceae seeds. *Latin Amer. App. Res.* v. 26, p.1-3, 1996.

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, 1951.

MATULEWICZ, M. C & CEREZO, A. S. Water-soluble sulphated polysaccharides from the red seaweed *Chatangium fastigiatum*. Analysis of the system and the structure of the  $\alpha$ -D-(1→3) linked mannans. *Carb. Polymers.* v.7, p.121-132, 1987.

MATULEWICZ, M. C & CEREZO, A. S. High resolution  $^{13}\text{C}$ -n.m.r. spectroscopy of mixed linkage xylans. *Int. J. Biol. Macromol.* v.14, p.29-32, 1992.

MILLER, I. J, FALSHAW, R; FURNEAUX, R. H. Structural analysis of the polysaccharide from *Pachymenia lusoria* (Cryptonemiacae, Phodophyta). *Carb. Res.* v.268, p.219-232, 1995.

MILLER, I. J & FURNEAUX, R. H. A structural analysis of the polysaccharide from *Kallymenia berggrenii* J. Ag. *Botanica Marina*, v.39, p.141-147, 1996.

MILLER, I. J & FURNEAUX, R. H. The structural determination of the agaroid polysaccharides from four New Zealand in the order Ceremiales by means of  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Botanica Marina.*, v.40, p.33-339, 1997.

MILLER, I; FALSHAW, R; FURNEAUX, R.H; HEMMINGSON, J. A Variation in the constituent sugars of the polysaccharides from New Zealand species of *Pachymenia* (Halymeniaceae). *Botanica Marina*, v.40, p.119-127, 1997.

MINKOVA, K; MICHAILOV, Y; TONCHEVA-PANOVA, T; HOUBAVENSKA, N. Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. *Pharmazie*, v.51, p.194, 1996.

- MOURADI-GIVERAUD, A; GIVERAUD, T; MORVAN, H; COSSON, J. Agar from *Gelidium latifolium* (Rhodophyceae, Gelidiales): biochemical composition and seasonal variations. *Bot. Mar.* v.35, p.153-159, 1992.
- MURRAY, P.R; DREW, W. L; KOBAYASHI, G. S; THOMPSON, J. H; *Microbiologia Médica*, Guanabara Koogan S. A, p.367-376, 1992.
- NAKASHIMA, H; KOBAYASHI, N; MOTOKI, Y; NIUSHUI, M; YAMAMOTO, N. Purification and characterization of an Avian Myeloblastosis and Human Immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrob. Agents Chemother.* p.1524-1528, 1987.
- NAHMIAS, A J; & KIBRICK, S. Inhibitory effect of heparin on herpes simplex virus. *J. Bacteriol.* v.87, p.1061-66, 1964.
- NAHMIAS, A J; KIBRICK, S; BERNFELD, P. Effect of synthetic and biological polyanions on *Herpes simplex virus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 115, p.993-996, 1964.
- NISHINO, T; YOKOYAMA, G; DOBASHI, K; FUJIHARA, M; NAGUNO, T. Isolation, purification and characterization of fucose- containing sulphated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activity. *Carb. Res.* v.186, p.119-129, 1989.
- NISHINO, T & NAGUNO, T. Structural characterization of the new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carb. Res.* v.211, p.77-90, 1991.
- NUNN, J, R. & PAROLIS, H. A polysaccharide from *Aeodes orbitosa*. *Carb. Res.* v.6, p.1-11, 1968.
- NUNN, J, R, PAROLIS, H; RUSSEL, I. Sulphated polysaccharides of the solariaceae family. Part I. Polysaccharide from *anatheca dentata*. *Carb. Res.* v.20, p.205-215, 1971.
- NUNN, J, R, PAROLIS, H; RUSSEL, I. The desulphated polysaccharide of *anatheca dentata*. *Carb. Res.* v.95, p.219-226, 1981.
- O'NEILL, A N. 3,6-anhydro-D-galactose as a constituent of  $\kappa$ -carrageenin. *J. Am. Chem. Soc.* v.77, p.2837-2839, 1955.
- PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. *The polysaccharides*, v.2, p.195-285, 1982.
- PAROLIS, H. The polysaccharides of *Pschymeria hieroglyphica* (= *P. langeri*) and *P. hymantophora*. *Carb. Res.* v.93, p.261-267, 1981.

PARK, J. T. & JOHNSON, M. J. A submicrodetermination of glucose. **J. B. Chem.** v.181, p.149-151, 1949.

PENMAN, A & REES, D. A Carrageens. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from algae. Structure of  $\xi$ -carrageenan. **J. Chem. Soc. Perkin I**, p.2181-2187, 1973.

PEARSON, L. C. **The diversity and evolution of plants**. CRC Press, p.115-141, 1995.

PRESTON, R. D. The physical biology of plant cell wall. **Chapman and Hall**, 491 p., 1974.

PUJOL, C. A; ERREA, M. I; MATULEWICZ, M. C; DAMONTE, E. B. Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulphated galactan. **Phytoth. Res.** v.10, p.410-413, 1996.

REES, D.A. Estimation of the relative amounts of isomeric sulphate esters in some sulphated polysaccharides. **J. Chem. Soc.** v. 81, p.5168-5171, 1961.

REES, D.A. The carrageenan system of polysaccharides. Part.I. The relation between the  $\kappa$  and  $\lambda$ -components. **J. Chem. Soc.** p.1821-1832, 1963.

RICHARDS, J. T; KERN, E. R; GLASGOW, L. A; OVERRALL, J. C. Jr; DEIG E. F; HATCH, M. T. Antiviral activity of extracts from marine algae. **Antimicrob. Chemother.** v.14, p.24-30, 1978.

SLONEKAR, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carb. Chem.** v.6, p.20-24, 1972.

SMITH, D. B. & COOK, W. H. Fractionation of carrageenin. **Arc. Biochem. Biophys.** p.232-233, 1953.

STEVENSON, T & FURNEAUX, R. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carboh. Res.** v.210, p.277-98, 1991.

STORTZ, C. A & CEREZO, A S. The potassium choride soluble carrageenans of the red seaweed *Iridea undulosa* B. **Carb. Res.** v.145, p.219-235, 1986.

STORTZ, C. A & CEREZO, A S. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of carrageenans: calculation of chemical shifts and computer-aided structural determination. **Carb. Polymers**, v.18, p.237-242, 1992.

TAKEMOTO, K. K; & SPICER, S. S. Effects of natural and synthetic sulfated polysaccharides on viruses and cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v.130, p.365-373, 1965.

TURVEY, J. R. & WILLIANS, E. L The structures of the some xylans from red algae. *Phytochemistry*, v.9, p.2383-2388, 1970.

TURVEY, J. R. & WILLIANS, E. L. The agar type polysaccharides from the red alga *Ceranum rubrum*. *Carb. Res.* v.49, p.419-425, 1976.

UENO, R; & KUNO, S. Dextran sulphate, a potent anti-HIV agent *in vitro* having synergism with zidovudine. *The Lancet*, v.13, p.1379, 1987.

USOV, A I; YAROTSKII, S. V; SHASKOV, A S.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymers*, v.19, p.977, 1980.

USOV, A I & ARKHIPOVA, V. S. Polysaccharides of algae. Methylation of polysaccharides of the kappa-carrageenan type from the red algae *Thchocarpus crinitus* (Gmel) Rupr., *Furcellaria fastigiata* (Huds) Lam. And *Phyllophora nervosa* (De Cand) Grev. *Bioorg. Khim.* v.7, p.385-390, 1981.

USOV, A I; IVANOVA, E. G & SHASHKOV, A S. Polysaccharide of algae XXXIII : Isolation and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan sea red seaweeds. *Bot. Mar.* v.26, p.285-294, 1983.

USOV, A I & ELASHVILII, M. Y . Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using partial reductive hydrolysis. *Bot. Marina*, v.34, p.553-560, 1991.

USOV, A I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, v.6, p.9-23, 1992.

STUEL P. M. **Atividade anticoagulante de  $\alpha$ - e  $\beta$ - D-glucanas extraídas do líquen *Ramalina celastri* modificadas quimicamente.** Tese de Mestrado em Bioquímica-UFPR, 1997.

WHYTE, J. N. C; ENGLAR, J. R; SAUNDERS, R. G; LINSAY, J. C. Seasonal variations in the biomass, quantity and quality of agar, from the reproductive and vegetative stages of *gracilaria* (*verrucosa* type). *Bot. Mar.* v.24, p.493-501, 1981.

WITVROUW, M; DEMYTER, J; DE CLERCQ, E. Establishement of a bioassay to determine serum levels of dextran sulfate and pentosan polysulfate, two potent inhibitors of human immunodeficiency virus. *J. AIDS*, v.3, p.343-47, 1990.

WITVROUW, M; DEMYTER, J. & DE CLERCQ, E. Antiviral portrait series: 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**. v.5, p. 345-59, 1994.

WUDUNN, D & SPEAR, P.G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. **J. Virology**, v.63, p.52-58, 1989.

YAPHE, W & DUCKWORTH, M. The relationship between the structural and biological properties of agars. **Proc. Int. Seaweed Symp.** v.7, p.15-22, 1972.

YAPHE, W & ARSENAULT, G. P. Improved resorcinol reagent for determination of fructose and 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. **Anal. Biochem.** v.13, p.143-148, 1965.

## **LISTA DE PUBLICAÇÕES**

### **I RESUMOS EM CONGRESSO**

#### **NACIONAL:**

NOSEDA, M. D; TULIO, S; PUJOL, C; DAMONTE, E; DUARTE M. E. R. Antiviral activity of sulfated polysaccharide extracted from red seaweed *Bostrychia montagnei*. *Anais da XXVI Reunião Anual da SBBq*, p. 104, C-47, 1997.

DUARTE, M. E. R.; TULIO, S; NOSEDA, M. D. Sulfated polysaccharide extracted from red seaweed *Bostrychia montagnei*. *Anais da XXVI Reunião Anual da SBBq*, p. 99, L-14, 1997.

#### **INTERNACIONAL:**

NOSEDA, M. D; TULIO, S; PUJOL, A C; DAMONTE, E; DUARTE, M. R. Polysaccharides from *Bostrychia montagnei* (Ceramiales, Rhodophyta): Chemical structure and antiviral activity. *Anais of XIV International Seaweed Symposium*. Cebu City, Philippines, p. 55, C-72, 1998.

### **II TRABALHO**

NOSEDA, M. D; TULIO, S; DUARTE, M. E. R. Polysaccharide from red seaweed *Bostrychia montagnei*: Chemical Characterization. *Hidrobiologia*, aceito em junho de 1998.