

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMANUELLE GEMIN

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
GALACTOMANANAS SULFATADAS CONTRA O VÍRUS
HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1)

CURITIBA

2008

EMANUELLE GEMIN

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
GALACTOMANANAS SULFATADAS CONTRA O VÍRUS
HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica), Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucy Ono

CURITIBA

2008

Gemin, Emanuelle

Determinação da atividade antiviral de galactomananas sulfatadas contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) / Emanuelle Gemin. – Curitiba, 2008.

90 f.: il. (ALGUMAS COLOR.); 29cm.

Orientadora: Lucy Ono

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

1. Microbiologia. 2. Virologia – Atividade Antiviral. I. Título.

CDD
CDU

TERMO DE APROVAÇÃO

EMANUELLE GEMIN

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GALACTOMANANAS
SULFATADAS CONTRA O VÍRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1)

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucy Ono
Departamento de Patologia Básica, UFPR

Dr.^a Neoli Lucyszyn

Prof.^a Dr.^a Sandra Martin
Departamento de Química, UTP-PR

Curitiba, 28 de fevereiro de 2008.

Dedico esse trabalho à minha família e a você meu amor, por terem me apoiado durante os bons e difíceis momentos que vivenciei, sempre me incentivando a seguir em frente e a nunca desanimar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por me proporcionar todas as chances que tive, por me apontar sempre o caminho correto a seguir e, principalmente, por me dar a oportunidade de conhecer a Medicina Veterinária e me apaixonar por ela.

Aos meus pais, João Francisco e Irene, a quem devo esta conquista, por dedicar suas vidas à família, por terem me ensinado a nunca desistir de lutar, a perseverar sempre e amar a Deus e ao próximo sobre todas as coisas.

A você meu querido, por ter me encontrado em um momento inusitado e por ter me amado desde então. A você Diogo, meu querido, por ser a fonte de minhas forças, meu alicerce, minha alegria de viver e, principalmente, meu amor.

Aos meus irmãos, Luiz Gabriel e Franciele Maria, pela amizade, carinho, companheirismo e paciência nos momentos mais críticos de minha vida como estudante e pesquisadora e, principalmente, pelo amor sempre demonstrado a mim em todos os instantes.

A toda minha família, especialmente Zélia, Benedito, Wilson e Margit, por todos os aconselhamentos nos momentos de dúvida, pelo reconhecimento de meu potencial e pela confiança que sempre depositaram em mim.

À Professora Lucy Ono, pelo acompanhamento e revisão do estudo, os quais me propiciaram um maior aprofundamento nas questões mais polêmicas da pesquisa.

Ao Professor Luiz Felipe Caron, por me ensinar não somente o conteúdo da disciplina que lecionava na graduação, mas por despertar em mim o amor pela profissão de Médico Veterinário e por fazer desabrochar a paixão que hoje sinto pela Veterinária. Por sua presença no laboratório, sempre de coração aberto, contagiando a todos com sua enorme vontade de viver e de propagar o bem por onde passa.

À Professora Maria Rita Sierakowski por ter cedido seu laboratório para que eu pudesse realizar a primeira parte da pesquisa, por ser sempre solícita ajudando e esclarecendo dúvidas a qualquer momento, com muita clareza e tranquilidade.

À Professora Vanete Thomaz Soccol, por ter me dado forças e me apoiado em um momento crítico de minha vida, em que a única coisa que precisava era compreensão. Obrigada por ter me entendido e ter demonstrado isso de forma tão

espontânea, o que fez o momento se tornar tão especial. Não esquecerei jamais seu apoio e serenidade quando me encontrava em desespero.

À Dr^a. Neoli Lucyszyn e à Professora Sandra Martin, por terem prontamente aceitado o convite para participar da banca avaliadora e por acreditarem no trabalho.

Ao Professor Antônio Felipe Wouk, por me ensinar que conhecimento, erudição, profissionalismo e seriedade são características primordiais e inerentes a um bom Veterinário.

Ao Professor Marcus Vinicius Ferrari, por me treinar para as condições mais adversas que um Veterinário enfrenta no dia a dia da profissão.

À Alltech do Brasil e a todos que nesta instituição trabalham, por me acolherem de braços abertos e me impulsionarem positivamente frente às dificuldades.

A você Francielli, ou melhor, Fran. Desde o primeiro momento que lhe conheci já a considerei minha verdadeira amiga. Por você estar sempre presente, aconselhando-me nos momentos de dúvida, compartilhando experiências de vida, profissionais, pessoais, etc., etc., etc. Pessoas especiais nunca são esquecidas e você é uma delas.

A você Carla, ou melhor, Carlinha, por todos os momentos de alegrias e divertimento que compartilhamos no Biopol e no Laboratório de Microbiologia. Por me acalmar quando precisei, por me ajudar sempre e incessantemente em todos os momentos que pedia ou mesmo naqueles em que não pedia. Pessoas especiais nunca são esquecidas e você é também uma delas.

A você Taíssa, ou melhor, Tatá, por me ensinar tudo o que sabia; por toda a paciência que comigo teve. Por sempre me ajudar sem mesmo eu cogitar a hipótese de lhe pedir. Por ser sempre doce e querida (assim como a Carla e a Fran) durante todo o período de nossa convivência intensa e até hoje. Pessoas especiais nunca são esquecidas e você também é uma delas.

Aos colegas do Biopol: Milena, Fran, Íris, Tati, Miriam, Clayton, Carol e Cris. Por sempre me ajudarem, mesmo naqueles momentos em que vocês teoricamente não poderiam. Por sempre conseguirem um tempinho para me explicar e ensinar coisas.

Às minhas queridas amigas Marina, Pate, Lu e Vê, por compartilharem comigo todas as suas experiências pessoais relacionadas às suas pós-graduações

strictu e latu sensu. Por estarem sempre presente desde a graduação até então.
Unidas sempre.

Aos verdadeiros amigos, pela força e sorriso sincero.

Aos animais, a quem me dedico para sempre.

RESUMO

O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é agente causador de feridas labiais e genitais que são notadamente dolorosas. Inúmeros esforços têm sido despendidos na procura de fármacos que possam servir ao tratamento do herpes. Estudos recentes trazem uma alternativa aos análogos de nucleosídeos; trata-se de polissacarídeos sulfatados. O presente estudo teve como objetivo purificar galactomananas obtida de goma guar (GN) e extraída de sementes de leucena (LN) as quais foram sulfatadas (LSA e GS). As amostras sulfatadas neste estudo, juntamente com uma amostra de leucena previamente sulfatada (LSB), foram empregadas em teste de atividade antiviral contra o HSV-1. Após purificação, os rendimentos obtidos para LN, LSA, GN e GS foram 66,3%, 35,0%, 57,0% e 36,6%, respectivamente. Dosagens de proteína, açúcar total, espectroscopia de infravermelho e análise por cromatografia líquido-gasosa foram efetuadas para caracterizar quimicamente as galactomananas. Para determinar a toxicidade dos polissacarídeos foi realizado teste de citotoxicidade *in vitro* composto por duas fases (experimento adsorção – que mimetiza a adsorção viral; pós-adsorção – que avalia a citotoxicidade após a adsorção dos vírus). Na fase adsorção, LN não apresentou citotoxicidade; esta apareceu no teste após adsorção à concentração de 250 µg/mL. No teste adsorção LSA apresentou toxicidade a 625 µg/mL e no pós-adsorção a partir de 2,0 µg/mL, evidenciando que quanto maior for o tempo em que as partículas permanecem em contato com o cultivo, maior é o dano causado por elas. GN e GS não apresentaram toxicidade na fase adsorção; já na fase pós-adsorção somente em concentração maior ou igual a 2500 µg/mL. Para avaliar a atividade antiviral, um experimento dividido em duas etapas foi realizado. LSA inibiu a replicação viral e reduziu o número de UFP no experimento adsorção, o que não foi verificado no experimento pós-adsorção. Já LSB apresentou redução de UFP estatisticamente diferente do controle nas duas fases do teste antiviral. GS e GN apresentaram atividade antiviral a 80 µg/mL. Não é possível inferir para GS que a atividade observada seja devido à presença de grupamentos sulfato, sendo necessário testar GN nas concentrações abaixo de 80 µg/mL para verificar se apresentará atividade antiviral semelhante ao derivado sulfatado.

Palavras-chave: Galactomanana. Antiviral. Leucena. Guar. Sulfatação.

ABSTRACT

Herpes simplex type 1 virus causes lip and genital wounds very painful. Great efforts have been made to develop drugs that could be used on herpes treatment. Recent studies bring some alternative treatments, which are different of nucleoside analog drugs: the sulfated polysaccharides. The objective of this study was to purify galactomannans extracted from leucena and to purify guar gum (native samples named LN and GN, respectively) and synthesize sulfated derivatives (named LSA and GS). Samples sulfated on this study and one sample previously sulfated were used on antiviral activity tests against HSV-1. After purifying and sulfating procedures, the purification yields for LN, LSA, GN and GS were 66,3%, 35,0%, 57,0% e 36,6%, respectively. Total protein and total sugar quantifications were performed, as well as infrared spectroscopy and gas-liquid chromatography analysis to establish chemical parameters of galactomannans. To evaluate polysaccharide toxicity, it was performed one *in vitro* citotoxicity test divided in two phases (adsorption test: which copies viral adsorption; post-adsorption test: to evaluate citotoxicity after viral adsorption period). On adsorption citotoxicity experiment, LN presented no degree of toxicity, which appeared only on post-adsorption phase, at 250 µg/mL. LSA on adsorption citotoxicity test presented cell toxicity at 625 µg/mL and 2,0 µg/mL on post-adsorption experiment, which evidences higher levels of cell toxicity on post-adsorption stage because of the long period of contact between sulfated polysaccharide and culture cells. LSB showed lower cell harmful damage than LSA on citotoxicity test. GN and GS did not presented cell toxicity on adsorption test; citotoxicity appeared only at concentrations above 2500 µg/mL on post-adsorption phase. To evaluate antiviral activity, an experiment divided in two phases was performed. LSA decreased viral replication on adsorption antiviral phase, which was not verified on post-adsorption. LSB statistically decreased PFU number on both antiviral phases, which could be explained by structural differences between two samples and/or by degree of sulfation. Both GN and GS presented antiviral activity at 80 µg/mL. It is not possible to conclude that the activity observed was due to sulfate presence in native polysaccharide. It is necessary to test GN at concentrations below 80 µg/mL, to verify a similar antiviral activity that was found on GS sample.

Palavras-chave: Galactomannn. Antiviral. Leucena. Guar Gum. Sulfation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA PARCIAL DE GALACTOMANANA PARCIALMENTE SUBSTITUÍDA, COM UNIDADES DE MANOSE EM LIGAÇÃO β - $(1\rightarrow4)$ E UNIDADES DE GALACTOSE EM LIGAÇÃO α - $(1\rightarrow6)$	03
FIGURA 2 - ESTRUTURA DO VÍRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1	10
FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HSV-1.....	12
FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DO HSV-1.....	14
FIGURA 5 - ESTRUTURA MOLECULAR DAS DROGAS ACICLOVIR, FAMCICLOVIR E PENCICLOVIR.....	17
FIGURA 6 - PLACA DE 96 POÇOS UTILIZADA PARA O TESTE DE CITOTOXICIDADE FRENTE A DIFERENTES DILUIÇÕES DE POLISSACARÍDEOS COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS.....	29
FIGURA 7 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA GN EM PASTILHA DE KBr.....	35
FIGURA 8 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA GS EM PASTILHA DE KBr.....	35
FIGURA 9 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA LN EM PASTILHA DE KBr.....	36
FIGURA 10 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA LSA EM PASTILHA DE KBr.....	36
FIGURA 11 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE GLC PARA A AMOSTRA GN.....	37
FIGURA 12 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE GLC PARA A AMOSTRA GS.....	37
FIGURA 13 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE GLC PARA A AMOSTRA LN.....	38
FIGURA 14 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE GLC PARA A AMOSTRA LSA.....	38
FIGURA 15 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIA OBTIDAS DA AMOSTRA GN	42
FIGURA 16 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIA OBTIDAS DA AMOSTRA GS	43
FIGURA 17 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIA OBTIDAS DA AMOSTRA LN	44

FIGURA 18 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIA OBTIDAS DA AMOSTRA LSA	46
FIGURA 19 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIA OBTIDAS DA AMOSTRA LSB	47
FIGURA 20 - MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO DO CONTROLE POSITIVO (AUSÊNCIA DE POLISSACARÍDEOS) APRESENTANDO CRISTAIS DE FORMAZAN 3h APÓS A ADIÇÃO DE MTT (AUMENTO DE 100x).....	48
FIGURA 21 - PLACAS DE 24 POÇOS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GALACTOMANANAS NATIVA E SULFATADA DE GUAR (GN, GS) E DE LEUCENA (LN, LSA, LSB).....	49
FIGURA 22 - CONTROLE NEGATIVO DE EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GN E GS (DURANTE ADSORÇÃO); CÉLULAS VERO CORADAS COM CRISTAL VIOLETA (AUMENTO DE 100x).....	50
FIGURA 23 - CONTROLE POSITIVO DE EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GN E GS – EXPERIMENTO DURANTE; ADSORÇÃO (HSV-1 ~100 UFP/POÇO) CÉLULAS VERO CORADAS COM CRISTAL VIOLETA (AUMENTO DE 100x).....	50
FIGURA 24 - CONTROLE POSITIVO DE EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GN E GS – EXPERIMENTO DURANTE ADSORÇÃO (HSV-1 ~100 UFP/POÇO); CÉLULAS VERO CORADAS COM CRISTAL VIOLETA (AUMENTO DE 250x).....	51
FIGURA 25 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV-1) DE GS, MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE ADSORÇÃO).....	52
FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV-1) DE GS, MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE PÓS-ADSORÇÃO).....	54
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV-1) DE LSA MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE ADSORÇÃO).....	55
FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV -1) DE LSA MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE PÓS-ADSORÇÃO).....	55

FIGURA 29 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV- 1) DE LSB, MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE ADSORÇÃO).....	56
FIGURA 30 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV- 1) DE LSB, MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE PÓS-ADSORÇÃO).....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ESPÉCIES DE HERPESVÍRUS QUE INFECTAM OS SERES HUMANOS.....	06
TABELA 2 -	DILUIÇÕES SERIADAS DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS E SULFATADOS DE LEUCENA E GUAR.....	27
TABELA 3 -	DOSAGENS DE PROTEÍNA E AÇÚCAR TOTAL DAS AMOSTRAS DE POLISSACARÍDEOS NATIVOS E SULFATADOS.....	34
TABELA 4 -	PROPORÇÃO MANOSE/ALACTOSE DAS AMOSTRAS NATIVAS E SULFATADAS.....	40
TABELA 5 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA NATIVA DE GUAR (GN) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO.....	76
TABELA 6 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA NATIVA DE GUAR (GN) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO.....	77
TABELA 7 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA DE GUAR (GS) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO.....	78
TABELA 8 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA DE GUAR (GS) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO.....	79
TABELA 9 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA NATIVA DE LEUCENA (LN) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO.....	80
TABELA 10 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA NATIVA DE LEUCENA (LN) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO.....	81
TABELA 11 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA A DE LEUCENA (LSA) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO.....	82

TABELA 12 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA A DE LEUCENA (LSA) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO.....	83
TABELA 13 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA B DE LEUCENA (LSB) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO.....	84
TABELA 14 -	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA B DE LEUCENA (LSB) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO.....	85
TABELA 15 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA DE GUAR (GS) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO.....	86
TABELA 16 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA DE GUAR (GS) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO.....	87
TABELA 17 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA A DE LEUCENA (LSA) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO.....	88
TABELA 18 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA A DE LEUCENA (LSA) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO.....	89
TABELA 19 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA B DE LEUCENA (LSB) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO.....	90

TABELA 20 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> DA GALACTOMANANA SULFATADA DE LEUCENA (LSB) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO.....	91
-------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACV	- Aciclovir
ACV-TP	- Aciclovir trifosfato
AIDS	- “Acquired Immune Deficiency Syndrome”
APTT	- Tempo de ativação parcial de tromboplastina
CC50	- Concentração citotóxica 50%
CI50	- Concentração inibitória 50%
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EBV	- Epstein Barr virus
ELISA	- “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
GAL	- Galactose
gC	- Glicoproteína viral C HSV-1
GLC	- Cromatografia líquida-gasosa
GN	- Galactomanana nativa de goma guar
GS	- Galactomanana sulfatada de goma guar
GTP	- Guanosina trifosfato
HIV	- human immunodeficiency virus
HCMV	- human cytomegalovirus
HHV	- human herpesvirus
HPV	- human papilomavirus
HS	- Heparan sulfato
HSV-1	- herpes simplex virus type 1
HSV-2	- herpes simplex virus type 2
Hve	- “Herpesvirus entry”
LN	- Galactomanana de leucena nativa
LSA	- Galactomanana de leucena sulfatada pelo autor
LSB	- Galactomanana de leucena sulfatada cedida pela Prof. ^a Maria Rita Sierakowski
MAN	- Manose
MTT	- Brometo de 3-(4’5’-dimetil-tiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazólio
SEAB-PR	- Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná

SFB	- Soro fetal bovino
TK	- Timidina quinase
TPB	- Meio triptose fosfato
TT	- Tempo de trombina
UL	- Região única longa
US	- Região única curta
VZV	- varicella zoster vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Galactomananas.....	02
1.2 Família <i>Herpesviridae</i>	05
1.3 Vírus herpes simplex.....	09
1.4 Antivirais utilizados no tratamento de HSV.....	16
1.5 Atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados.....	19
2. OBJETIVOS	23
2.1 Gerais.....	23
2.2 Específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Obtenção das amostras de galactomananas.....	24
3.2 Purificação dos polissacarídeos.....	24
3.3 Métodos Gerais.....	25
3.4 Espectroscopia de infravermelho.....	26
3.5 Obtenção dos derivados sulfatados dos polissacarídeos a serem utilizados em testes de atividade antiviral.....	26
3.6 Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de leucena e guar em células VERO.....	27
3.7 Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de leucena e guar contra o HSV-1 <i>in vitro</i>	30
3.8 Análises estatísticas.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Purificação dos polissacarídeos e obtenção dos derivados sulfatados.....	33
4.2 Dosagens de proteína, açúcar total e sulfato.....	34
4.3 Análise de Infravermelho.....	35
4.4 Análise por cromatografia líquido-gasosa.....	38
4.5 Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de guar e de leucena em células VERO.....	41
4.6 Teste de atividade antiviral <i>in vitro</i> das galactomananas nativas e sulfatada de guar e de leucena contra o HSV-1.....	48
5. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

Diversos vírus e hospedeiros naturais desenvolvem entre si relações de complexidade ímpar. Sabe-se que, para a existência destas microscópicas formas de vida, é imprescindível a presença de outro organismo desempenhando o papel de hospedeiro. E é neste ponto que reside uma grande controvérsia, pois para subsistir, os vírus devem suportar constantes ataques do sistema imunológico de quem os alberga. Para muitos vírus, a solução para este paradoxo criado pela natureza é a chamada co-evolução (LUIPI, 2003).

Provavelmente, um dos melhores exemplos desta co-evolução seja o vírus herpes simplex (HSV). Isto porque uma de suas principais características é causar eventuais recorrências infectivas, as quais permitem sua disseminação lenta e progressiva, propiciando por muitas vezes o convívio com o hospedeiro humano durante toda a vida.

Os grupos que podem apresentar a doença causada pelo vírus do herpes de forma disseminada geralmente são recém-nascidos (contaminados pela mãe infectada durante sua passagem pelo canal do parto) e indivíduos com diminuição de imunidade celular secundária à AIDS ou quimioterapia anti-rejeição para pacientes transplantados (SAMUELSON; LICHTENBERG, 1994; BRASIL, 2001).

O herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é associado a lesões de membranas mucosas e pele, de face e de tronco. Mas as lesões de maior prevalência são as da cavidade oral (herpes orolabial). Após a infecção primária, o vírus pode permanecer em latência em gânglios que inervam o sítio da doença primária, como gânglios de nervos cranianos ou da medula, e, quando é reativado, o vírus pode migrar através de nervos periféricos, ocasionando recidivas da infecção (BRASIL, 2001).

OBARA, FURUTA, TAKASO *et al.* (1997) em seus estudos sobre as doenças cutâneas demonstraram que o HSV-1 é isolado principalmente de lesões orolabiais inervadas pelo nervo Trigêmeo. Já o herpes simplex tipo 2 (HSV-2) é freqüentemente isolado de lesão da área genital, inervados pelo gânglio sacral. Entretanto, outros gânglios podem ser infectados pelo vírus, visto que também são encontradas vesículas herpéticas nos membros superiores, dorso das mãos e nos glúteos.

Inúmeros esforços têm sido despendidos para o desenvolvimento de fármacos que pudessem servir adequadamente ao tratamento do herpes ou ainda formas de prevenção desta enfermidade, como as vacinas. Há uma procura evidente, principalmente no que diz respeito à descoberta de drogas que inibam seletivamente determinados processos relacionados ao metabolismo viral. Diversos estudos mostram uma nova alternativa de tratamento que não os antivirais conhecidos de todos (análogos de nucleosídeos). Trata-se da atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados.

A presença do grupamento sulfato na molécula desses açúcares parece ser essencial para a propriedade antiviral, relacionando-a a uma inibição do ataque viral às células hospedeiras pelo fato de impedir o processo de adesão do vírus, imprescindível à sua internalização (um dos primeiros passos envolvidos no processo de replicação viral). Esta adesão ocorreria entre as glicoproteínas virais e a substância heparan sulfato, presente na superfície da célula hospedeira (HEROLD *et al.*, 1995).

Esses mesmos estudos tentam encontrar associações lógicas entre a propriedade antiviral e a estrutura química e/ou grau de sulfatação dos polissacarídeos sulfatados, como as xilogalactanas (DAMONTE *et al.*, 1996), galactanas (AMORNUT *et al.*, 1995), carragenanas (CARLUCCI *et al.*, 1997), glucanas ou dextranas sulfatadas (NEYTS *et al.*, 1995) e mananas (KOLENDER *et al.*, 1997) as quais têm apresentado baixo ou nenhum potencial citotóxico, quando testadas em concentrações efetivas ao combate da atividade viral.

Durante as últimas décadas, diferentes ingredientes bioativos advindos de um grande número de espécies de plantas têm sido investigados. Destes, aproximadamente 10% têm-se demonstrado promissores quanto à atividade antiviral (CHE, 1991). Estudos com filtrados de plantas medicinais como antraquinonas (SYDISKIS *et al.*, 1991), flavonóides (LIN *et al.*, 2000), floroglucinol (ARISAWA *et al.*, 1990), polissacarídeos (MARCHETTI *et al.*, 1994), triterpenos (SIMONES *et al.*, 1999) e derivados de catequinas (FERREA *et al.*, 1993) apresentaram atividade inibitória contra a replicação do HSV. Algumas destas substâncias, como o n-docosanol, já passaram ou ainda estão passando por testes clínicos, fase final para colocação no mercado farmacêutico (POPE *et al.*, 1996). Todos estes achados sugerem que produtos naturais configuram uma importante fonte para novos agentes anti-herpéticos em potencial.

As substâncias químicas podem apresentar efeitos deletérios ou adversos nos organismos vivos, os quais são dose-dependentes. Portanto, compostos que apresentem potencial terapêutico necessitam ser avaliados quanto à sua toxicidade, uma vez que substâncias com ótima atividade biológica, porém com elevada toxicidade exibem altos riscos na sua utilização. A medida da determinação da toxicidade é, dessa forma, um parâmetro importante para avaliar a margem de segurança da utilização dessas substâncias (GILMAN *et al.*, 1991).

Os testes iniciais de toxicidade podem ser feitos *in vitro* sobre células em cultura, procurando-se determinar a concentração necessária do composto estudado que produz morte (inviabilidade) de 50% da população celular (dose citotóxica 50% ou DC50).

As culturas celulares são o resultado do crescimento de células dispersas de fragmentos de tecidos em um ambiente específico, com um meio contendo nutrientes, hormônios, além de substrato adequado; nessa etapa, constituem uma cultura primária. Depois da primeira subcultura, o cultivo primário pode evoluir até uma linhagem celular que pode ser repicada por diversas vezes (FRESHNEY, 1990). A maior vantagem apresentada pela utilização de cultura na determinação da citotoxicidade é que células vivas podem ser observadas ao microscópio invertido, o que permite uma monitoração regular de sua viabilidade.

Por outro lado, ensaios *in vitro* não substituem os testes e experimentos *in vivo*, uma vez que os ensaios de citotoxicidade (utilizando culturas celulares) apenas determinam a toxicidade da substância química somente quando ela permanece em contato com a cultura na sua forma inalterada por um dado período de tempo, porém, são válidos como um trabalho preliminar, pois se o composto testado produz efeitos deletérios sobre diferentes linhagens celulares, muitos deles podem ser esperados se o produto for aplicado em animais (ADAMS, 1990).

1.1 Galactomananas

As galactomananas são polissacarídeos neutros, extraídos do endosperma de certas espécies de leguminosas, constituindo o segundo maior grupo de açúcares de reserva de energia nas plantas superiores. Sua estrutura é dada por um esqueleto constituído de repetidas unidades de α -D-manose, que se encontram

unidas por ligações glicosídicas do tipo (1→4). Unidades de α -D-galactose apresentam-se presas à cadeia principal por ligações do tipo (1→6), como substituintes (GANTER, 1991; PETKOWICZ *et al.*, 1998). Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 1.

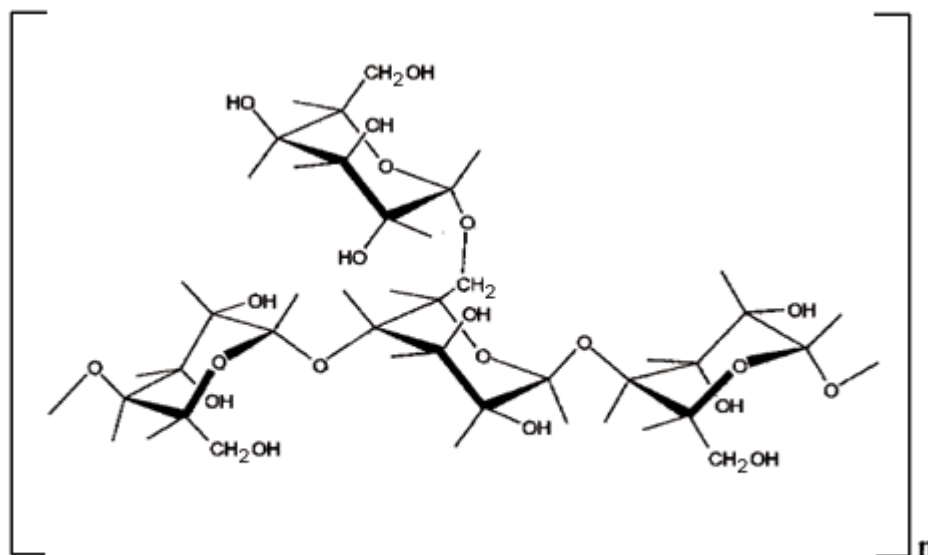


FIGURA 1 - ESTRUTURA PARCIAL DE GALACTOMANANA PARCIALMENTE SUBSTITUÍDA, COM UNIDADES DE MANOSE EM LIGAÇÃO β -(1→4) E UNIDADES DE GALACTOSE EM LIGAÇÃO α -(1→6)

Fonte: MERCE *et al.*, 2001.

No Brasil, a grande diversidade existente entre as galactomananas tem sido explorada em menor grau. As sementes são consideradas uma fonte produtora renovável, visto que elas advêm de frutos e isso não acarreta a destruição da árvore. Além disso, são encontradas de forma abundante na natureza. Estudos demonstram que os rendimentos advindos da extração, em inúmeras vezes, são superiores a 30% da massa seca das sementes (GANTER, 1991; PETKOWICZ *et al.*, 1998; AMARAL, 1998).

A proporção entre monômeros de galactose e manose presentes na estrutura da galactomanana variam de acordo com as espécies às quais pertencem, além de sofrer com a interferência climática e, por isso, pode-se obter diferentes graus de substituição nesses biopolímeros (MERCE *et al.*, 2001).

Sementes de leguminosas arbóreas vêm sendo estudadas, tendo em vista sua utilização na nutrição humana ou animal em algumas regiões, em épocas de

escassez de alimento, ou ainda como forma de valorização e preservação dos recursos naturais. Pesquisas com diversas espécies de diferentes partes do mundo vêm sendo conduzidas, tais como: *Vicia faba* L. da região da Antalya; *Acacia coleii* e *Acacia tumida*, alimentos tradicionais do povo aborígine australiano; *Cassia floribunda* do sul da Índia; *Lathyrus maritimus* L. característica de praias em países como o Japão e o Canadá; *Centrosema pubescente*, *Tamarindus indica* e *Cassia alata* na Nigéria; além das leguminosas selvagens do deserto de Sonora, no México. Sementes e vagens do gênero *Acacia*, *Olneya* e *Prosopis* têm sido utilizadas em diversos países para consumo humano e animal (MATUDA; MARIA NETO, 2005).

As sementes de leguminosas também são utilizadas como fonte de galactomananas (componentes presentes nas sementes de plantas pertencentes à família Leguminosae) e xiloglucanas (grupo das fibras solúveis) pelas indústrias de alimentos e farmacêutica (MATUDA; MARIA NETO, 2005).

As galactomananas também estão presentes em outros seres como os fungos e as algas marinhas. As algas vermelhas contêm uma grande quantidade de polissacarídeos em sua estrutura, como as galactanas sulfatadas, componente de maior importância da matriz polissacarídica. Elas são compostas por cadeias lineares formadas por resíduos alternados de 3- β -D-galactopiranosil e 4- α -galactopiranosil. Os últimos resíduos são da série D para as carragenanas e da série L para as agaranas. Essas estruturas são freqüentemente substituídas por ésteres sulfatados, ácido pirúvico, grupamentos metoxil e podem apresentar diferentes graus e tipos de ramificações. Estudos prévios descreveram a ação inibitória efetiva desses polissacarídeos naturalmente sulfatados contra alguns tipos virais, tais como HSV-1, HSV-2 e HIV (TALARICO *et al.*, 2004).

As propriedades reológicas das galactomananas e xiloglucanas determinam seu uso como emulsificantes, espessantes e dispersantes. Existem galactomananas que são obtidas de sementes de três espécies produzidas em escala industrial: a goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub), a alfarroba (*C. siliqua*) e goma tara (*Caesalpinia spinosa* L.) que são responsáveis pela terceira maior produção industrial de polissacarídeos (depois da celulose e do amido). A única fonte de xiloglucanas explorada comercialmente é o *Tamarindus indica*, a qual é utilizada em alimentos no Japão (MATUDA; MARIA NETO, 2005).

As galactomananas podem ser usadas em diversos processos industriais, tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia, e algumas que antes não

eram tão utilizadas vêm sendo empregadas em substituição à goma guar, alfarroba, etc., em se tratando de suas propriedades reológicas e de sua solubilidade dependente do grau de substituição (MERCE *et al.*, 2001).

O íon ferro está envolvido em processos biológicos de grande complexidade. Não se encontra inter-relacionado somente em fenômenos de óxido-redução e na bioenergética, mas também em muitas reações ácido-base. A habilidade das galactomananas e arabinogalactanas em quelar íons metálicos apresenta grande aplicabilidade na indústria alimentícia, pelo fato de poderem prover minerais essenciais em alimentos utilizados na dieta (MERCE *et al.*, 2001).

A goma guar, polissacarídeo que funciona como fibra dietética, é uma galactomanana formadora de géis, obtida da porção endospermal da planta *Cyamopsis tetragonolobus L.*, uma leguminosa que é originária principalmente da Índia e do Paquistão. Suas sementes e derivados são utilizados tanto na alimentação animal quanto humana. Estudos relataram seu primeiro emprego em produtos alimentícios nos Estados Unidos em 1949. Desde 1953, as sementes da planta guar vêm sendo processadas em goma, a qual é amplamente empregada nos alimentos como espessante e emulsificante (YOON *et al.*, 2008).

A Goma guar é composta estruturalmente por uma cadeia longa de unidades β -D-mananopiranosil ligadas conjuntamente por ligações glicosídicas do tipo β -D-(1 \rightarrow 4). A hexose ligada ao longo dessa cadeia é composta por resíduos de α -D-galactopiranosose e esses grupos laterais aparecem em ambos os lados da cadeia principal. Por isso, a proporção manose:galactose da goma guar se aproxima de 2:1 (YOON *et al.*, 2008).

Existem muitos benefícios quanto à inclusão de guar em dietas humanas. Por ser extremamente viscosa, pode ocorrer uma diminuição na eficiência protéica e na utilização lipídica, por interferir na digestão e absorção dos nutrientes de quem a ingere. Por isso, seu uso em formulações enterais deve ser cauteloso. Quando dissolvida em água, a goma guar pode provocar um esvaziamento gástrico lento promovendo uma sensação maior de saciedade, sendo também utilizada em formulações destinada à perda de peso (YOON *et al.*, 2008).

A *Leucaena leucocephala* é um arbusto perene, originário da América Central. Também é cultivada como planta forrageira e utilizada na alimentação de ruminantes, devido ao seu alto grau de proteína bruta, o qual poderia ser comparado ao de outras espécies forrageiras de uso corrente na nutrição animal, como por

exemplo, a alfafa. Além disso, possui boa palatabilidade o que aumenta sua aceitação, melhorando o ganho de peso final e a produção leiteira (ONO, 2004).

Entretanto, a leucena apresenta em suas sementes um importante fator anti-nutricional: a mimosina, aminoácido análogo da tirosina. A ele são atribuídos alguns sinais clínicos encontrados nos animais após a ingestão como anorexia, alopecia, diminuição da fertilidade e, em alguns casos, a ocorrência de morte. Os animais que consomem até 3% de seu peso vivo em massa de forragem não apresentam tais sinais. A mimosina exerce sua toxicidade pelo bloqueio de vias metabólicas de aminoácidos aromáticos e triptofano. Isso se dá por sua propriedade de quelar minerais, antagonizar a ação da vitamina B6 e inibir a síntese de DNA e RNA (ONO, 2004).

1.2 Família *Herpesviridae*

O HSV-1 é um herpesvírus pertencente à família *Herpesviridae*, a qual apresenta mais de 100 espécies dentre as quais estão incluídas os vírus que causam, em humanos, herpes genital, labial, herpes zoster, além de várias outras doenças em animais. Ele é o agente causador das feridas labiais, as quais são notadamente dolorosas e que no início apresentam-se na forma de vesículas, e, posteriormente, pústulas (WHITLEY; KIMBERLIN, 1998; ITZHAKI; WOSNIAK, 2006).

Os membros pertencentes à família *Herpesviridae* são aqui classificados de acordo com a arquitetura do vírion. Um herpesvírus típico consiste em uma fita dupla de DNA linear que está contido no seu interior; um capsídeo de formato icosaédrico de aproximadamente 100 a 110nm de diâmetro, formado de 162 capsômeros; apresenta-se com uma aparência amorfa, devido à presença de um tegumento ao redor do capsídeo; apresenta ainda, um envelope contendo glicoproteínas virais inseridas na sua superfície (KNIPE; HOWLEY, 2001).

Os representantes desta família estão altamente disseminados na natureza e muitas espécies animais apresentam no mínimo uma espécie de vírus do herpes que o infecta. Porém, como poucos herpesvírus infectam mais de uma espécie, o número de indivíduos pertencentes a esta família parece exceder aproximadamente 130 espécies já identificadas. Até então, nove diferentes vírus foram isolados de humanos, sendo eles: herpes simplex virus 1 (HSV-1), herpes simplex virus 2 (HSV-

2), human cytomegalovirus (HCMV), varicella-zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV) e herpesvirus 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 e HHV-8) (KNIPE; HOWLEY, 2001). A Tabela 1 traz as principais espécies de herpesvírus que infectam seres humanos.

TABELA 1 - ESPÉCIES DE HERPESVÍRUS QUE INFECTAM SERES HUMANOS

Designação	Sinônimo	Subfamília	%G+C ¹	Grupo	Tam. do genoma ² (kbp)	Abreviatura
<i>Human herpesvirus 1</i>	herpes simplex vírus 1	α	68.3	E	152	HSV-1
<i>Human herpesvirus 2</i>	herpes simplex vírus 2	α	69	E3	152	HSV-2
<i>Human herpesvirus 3</i>	varicella zoster vírus	α	46	D	125	HHV-3
<i>Human herpesvirus 4</i>	Epstein-Barr vírus	γ	60	C	172	HHV-4
<i>Human herpesvirus 5</i>	cytomegalovírus	γ	57	E	248	HHV-5
<i>Human herpesvirus 6A</i>		β	43	A	159/170 ^b	HHV-6 ^a
<i>Human herpesvirus 6B</i>		β	43	A	162/168 ^b	HHV-6B
<i>Human herpesvirus 7</i>		β	36	A	145	HHV-7
<i>Human herpesvirus 8</i>	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus	γ	59	C	170/210 ^b	HHV-8

¹Percentual de guanosina + citosina; ²Tamanho do genoma viral (kbp)
Fonte: KNIPE; HOWLEY (2001).

Os herpesvírus conhecidos compartilham de quatro propriedades biológicas significantes:

1) Todos eles especificam um grande conjunto de enzimas envolvidas em diversas ações de seu metabolismo, tais como o metabolismo de ácidos nucleicos pela ação das enzimas timidina quinase, timidilato sintetase, dUTPase, ribonucleotídeo redutase; aquelas envolvidas na síntese de DNA, como a DNA polimerase, helicase e primase; e as enzimas envolvidas em processamento de proteínas como as quinases. Entretanto, a quantidade exata de enzimas que cada vírus pertencente à família *Herpesviridae* apresenta pode variar (KNIPE; HOWLEY, 2001).

2) A síntese do DNA viral e a organização do capsídeo ocorrem no núcleo da célula e o capsídeo é envelopado assim que passa pela membrana nuclear. Assim que passa do núcleo para o citoplasma, o vírion pode sofrer maturação interna e

receber um envelope simples ou perder o envelope e posteriormente recebê-lo novamente assim que passar pela membrana citoplasmática.

3) A produção da infecção da progênie viral é invariavelmente acompanhada pela destruição da célula infectada.

4) Os herpesvírus examinados até o presente momento possuem a habilidade de permanecerem latentes em seus hospedeiros naturais. Nas células que acolhem os vírus latentes, o genoma viral toma a forma de uma molécula circular fechada, e somente uma pequena porção dos genes virais é expressa. O genoma nesta fase retém a capacidade de replicação e de causar a doença após a reativação. Os mecanismos moleculares precisos que levam à reativação do estado de latência não estão ainda totalmente elucidados e podem diferir de um vírus para outro (KNIPE; HOWLEY, 2001).

A família *Herpesviridae* é classificada inicialmente em três subfamílias, sendo elas: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Esta classificação é baseada nas propriedades biológicas e nas seqüências de DNA de cada membro da família já conhecidos (KNIPE; HOWLEY, 2001).

Os membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* foram classificados por apresentarem ciclo de replicação relativamente curto, rápida disseminação na cultura, destruição eficiente das células infectadas e capacidade de estabelecer infecções latentes primariamente (mas não exclusivamente) em gânglios sensoriais. Esta subfamília é representada pelos gêneros *Simplexvirus* (HSV-1), *Varicellovirus* (VZV), *Marek's disease-like virus* e *Infectious laryngotracheitis-like virus* (KNIPE; HOWLEY, 2001).

Os representantes da subfamília *Betaherpesvirinae* apresentam ciclo reprodutivo longo e o progresso da infecção acontece de forma lenta na cultura. As células infectadas freqüentemente se tornam entumecidas (citomegalia). O vírus pode se manter na forma latente em glândulas secretórias, células linforreticulares, rins e outros tecidos. Esta subfamília é representada pelos gêneros *Cytomegalovirus* (HCMV), *Muromegalovirus* (Citomegalovirus Murina) e *Roseolovirus* (HHV-7) (KNIPE; HOWLEY, 2001).

Todos os componentes da subfamília *Gammaherpesvirinae* se replicam *in vitro* em células linfoblásticas, sendo que alguns representantes causam infecções líticas em alguns tipos de células epitelióides e fibroblásticas. Os vírus presentes neste grupo infectam especificamente linfócitos T e B. Suas formas latentes destes

vírus são freqüentemente encontradas em amostras de tecidos linfóides. Esta subfamília contém dois gêneros: *Lymphocryptovirus* (EBV) e *Rhadinovirus* (AtHV-2 e SaHV-2) (KNIPE; HOWLEY, 2001).

1.3 Vírus herpes simplex

A palavra herpes deriva do verbo grego que significa rastejar, arrastar-se, mover-se furtivamente. Foi usada nos manuscritos de Hipócrates para descrever algumas lesões cutâneas disseminadas, há aproximadamente 25 séculos atrás. Os vírus herpes simplex tipo 1 e 2 se espalham dos sítios iniciais da infecção (na pele ou superfície mucosa) para os corpos celulares de neurônios ganglionares com o intuito de estabelecer uma infecção latente, formando então uma relação vírus-hospedeiro única e longa. Estudos filogenéticos indicam que todos os nove herpesvírus que infectam humanos são derivados de um único genoma ancestral viral (PEPOSE; KEADLE; MORRISON, 2006).

A diferenciação do HSV-1 e HSV-2 data de aproximadamente 8 a 10 milhões de anos atrás e a evolução deles com relação ao tropismo para diferentes locais anatômicos, como o epitélio da orofaringe e o trato genital ocorreu neste mesmo período. Para que eles divergissem e tivessem seus próprios tropismos teciduais, os sítios oral e genital tiveram que se tornar microbiologicamente isolados um do outro durante a manutenção do contato oral-oral e genital-genital. Tem sido postulado que determinadas mudanças nos hábitos sexuais dos ancestrais humanos – a contínua atração sexual das fêmeas ancestrais durante todo o ciclo menstrual (com um conseqüente aumento na freqüência das atividades sexuais) e a adoção de um relacionamento mais próximo – puderam prover as condições necessárias para a divergência viral de HSV-1 e HSV-2 de forma tão eficaz quanto à disparidade patobiológica (KALINYAK; FLEAGLE; DOCHERTY, 1977; COREY *et al.*, 1983; JOHNSON; NAHMIAS, 1989; YOOSOOK; CHANTRATITA; RIMDUSIT, 1989; WHITLEY; KIMBERLIN, 1998; PEPOSE; KEADLE; MORRISON, 2006).

Assim como a biologia e a virulência do HSV são influenciadas pelas características genéticas do hospedeiro, algumas mudanças sociais, comportamentais e de modos sexuais, tanto em países industrializados como em desenvolvimento, levaram a dramáticas mudanças na epidemiologia do vírus. Estes

fatores associados aos costumes sociais influenciam a idade da primeira infecção por ele. Somando-se ainda as mudanças que ocorreram nas práticas sexuais entre indivíduos na idade adolescente e adulta possivelmente influenciaram a aquisição de HSV-1 e HSV-2 em diferentes sítios anatômicos (HARDIN, 1996; MURRAY; PIZZORNO, 1999 PEPOSE; KEADLE; MORRISON, 2006). Isto pode em parte ser explicado pela recente explosão da AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) e do medo de adquirir o vírus HIV por contato genital-genital, o que não ocorre no contato oral-genital (PEPOSE; KEADLE; MORRISON, 2006).

Durante a co-evolução do vírus herpes simplex e de seus hospedeiros, este DNA vírus adquiriu uma grande quantidade de genes imunomodulatórios para combater a resposta imune do hospedeiro, assim como este continuou a improvisar um aumento complexo e redundante no seu sistema imune na tentativa de conter a infecção viral. Por exemplo, seguindo a infecção aguda (e a infiltração de células inflamatórias) do gânglio do Nervo Trigêmio, o HSV-1 alcança o estado de latência tanto inibindo células TCD8⁺, cujo papel é induzir a apoptose de células neuronais quanto protegendo tipos específicos de células afetadas do reconhecimento do sistema imune pela inibição de vários mecanismos antivirais do hospedeiro. As estratégias imunomodulatórias desenvolvidas pelo vírus ajudam-no a manter uma relação de permanência estável com seu hospedeiro (impossibilitando a sua erradicação do hospedeiro) e impedem o desenvolvimento de uma vacina anti-HSV (PEPOSE; KEADLE; MORRISON, 2006).

Os primeiros sintomas das infecções pelo herpesvírus tipo 2 incluem sinais prodrômicos semelhantes a uma gripe, com febre, dores de cabeça, mal-estar, indisposição, mialgias difusas seguidas de sintomas localizados que consistem em prurido genital, disúria, lesões, pápulas dolorosas por toda a região genital e ulcerações (HARDIN, 1996; MURRAY; PIZZORNO, 1999).

As manifestações clínicas da doença exibem diferentes graus de severidade em indivíduos normais e imunodeficientes (REEVES *et al.*, 1981; WHITLEY; ROIZMAN, 1987). Deve-se ressaltar que em indivíduos imunocomprometidos e neonatos o HSV pode causar sérias infecções sistêmicas. Além disso, as infecções por HSV-2 podem se tornar um fator de risco para a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SEVERSON; TYRING, 1999).

O vírus do herpes tem uma estrutura similar à representada na Figura 2. Ele possui uma dupla fita de DNA como material genético a qual se encontra

linearmente dentro da partícula. Ela está protegida por um capsídeo de origem protéica que é circundado por uma segunda camada de proteínas denominada de tegumento. Este último apresenta-se coberto externamente por um envelope lipídico, no qual algumas glicoproteínas estão inseridas (ITZHAKI; WOSNIAK, 2006).

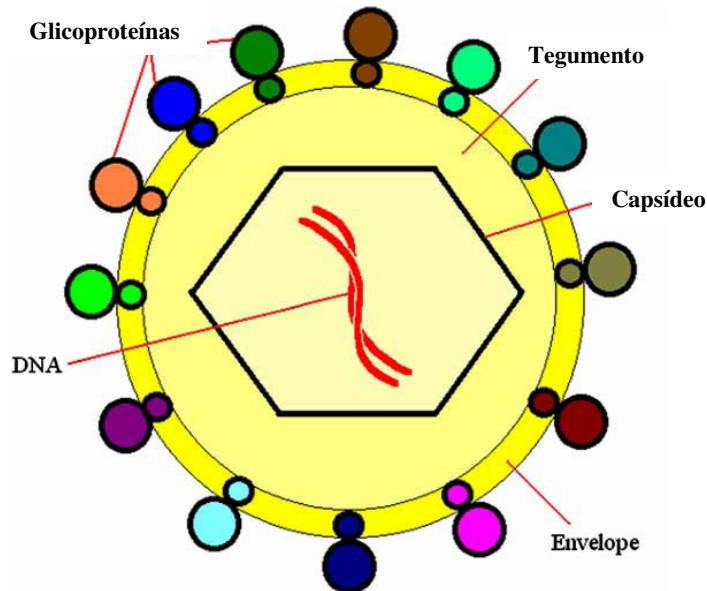


FIGURA 2 - ESTRUTURA DO VÍRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1

Fonte: ITZHAKI; WOSNIAK (2006)

O capsídeo do vírus tem aproximadamente 15nm de espessura e diâmetro próximo a 20nm. Ele é feito a partir da montagem de 162 pequenas estruturas denominadas de capsômeros, as quais se encontram arranjadas no formato de um icosaedro. O tegumento é formado por um complexo de proteínas o qual é utilizado para ancorar o envelope lipídico ao capsídeo; ele contém algumas proteínas que atuam nos estágios iniciais de infecção do vírus. Recobrimo o tegumento está o envelope viral que contém várias glicoproteínas, as quais estão envolvidas na entrada do vírus dentro da célula e na evasão do sistema imune (ITZHAKI; WOSNIAK, 2006).

O tamanho do genoma do HSV-1 é de aproximadamente de 152kb; ele contém uma grande proporção dos nucleotídeos guanina e citosina. O genoma apresenta seqüências únicas e regiões de repetição, sendo que ambas codificam genes. As regiões únicas são separadas em seqüências longa e curta, sendo que cada uma delas é seguida por uma região de repetição invertida, que pode ser convertida dando origem a quatro isômeros do genoma (ITZHAKI; WOSNIAK, 2006)

representados na Figura 3. Nela, a indicação (a) representa o genoma do HSV-1 que contém duas regiões únicas – a curta e a longa – e cada uma delas está seguida de regiões invertidas de repetição e ambas codificam genes. A indicação (b) representa a existência de quatro possibilidades de configuração do genoma do herpesvírus, sendo que todas elas ocorrem em quantidades iguais. A nomenclatura *a*, *b* e *c* representa as regiões de repetição; *a'* o inverso de *a*; *b'* o inverso de *b*; *c'* o inverso de *c*. US: região única curta. UL: região única longa.

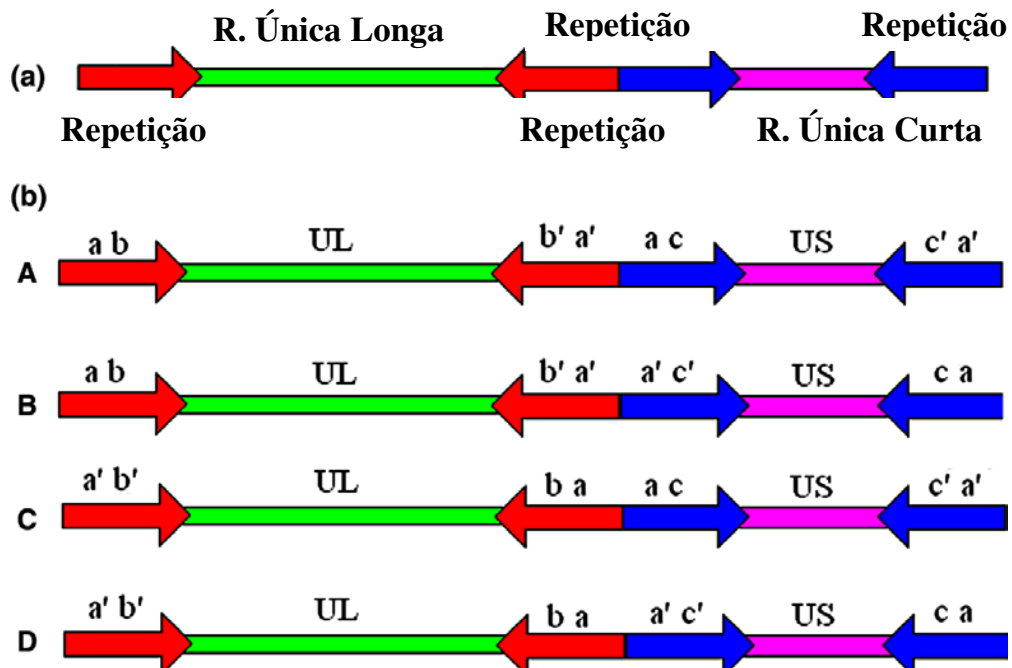


FIGURA 3 - ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HSV-1

Fonte: ITZHAKI; WOSNIAK, 2006

O HSV-1 tem dois tipos de ciclos de vida: um produtivo, no qual a progênie viral é replicada e as células hospedeiras destruídas, e o ciclo de latência, no qual o genoma viral persiste dentro da célula infectada, mas nenhuma partícula é produzida.

O ciclo produtivo do herpesvírus (FIGURA 4) envolve a entrada do vírus na célula, transporte da partícula viral para o núcleo, expressão das proteínas virais no citoplasma da célula, transporte do material protéico recém-formado para dentro do núcleo, reunião dos componentes produzidos e, finalmente, o egresso das partículas virais recém formadas (KRUMMENACHER *et al.*, 1998). Inicialmente, o vírus se adere à superfície celular ligando duas de suas glicoproteínas do envelope (glicoproteínas B e C) (GERBER; BELVAL; HEROLD, 1995) a um proteoglicano

presente na superfície da célula hospedeira denominado heparan sulfato (HS) (WUDUNN; SPEAR, 1989). Então, ocorre a ligação do vírus ao seu receptor específico presente na superfície celular, denominado Hve ou *herpesvirus entry* (um membro da família dos receptores de fator de necrose tumoral - HveA) e à nectina-1, um membro da superfamília de imunoglobulinas que também são receptores do poliovírus (MONTGOMERY *et al.*, 1996; GERAGHTY *et al.*, 1998). As moléculas de HS, após modificações específicas, também podem funcionar como receptores de entrada para o HSV-1. Para que ocorra a interação entre os receptores e a partícula viral, a glicoproteína D presente no envelope se faz necessária (KRUMMENACHER *et al.*, 1998). Após a união da célula hospedeira e da partícula viral, o vírus se funde com a membrana celular de forma independente de pH. Esta entrada também poderá ocorrer por endocitose da partícula viral, o que requer pH mais baixo, com o transporte do vírus ocorrendo por meio de um compartimento intracelular ácido ou endossoma (NICOLA; MCEVOY; STRAUS, 2003).

A figura a seguir traz uma representação esquemática das fases do processo replicatório viral. Nela, a indicação (a) representa o vírus que se liga à superfície celular por meio das proteínas B e C. A indicação (b) representa o vírus se unindo através da glicoproteína D a um receptor celular específico; (c) indica a fusão do vírus com a membrana celular deixando livres no citoplasma o tegumento e capsídeo viral; (d) representa uma das proteínas do tegumento responsável por parar a síntese protéica celular. Em (e) o capsídeo se move até o núcleo e se desmonta liberando o DNA viral (que se torna circular) no núcleo da célula. A expressão dos genes α se inicia. Em (f) ocorre a expressão dos genes β . Em (g) o DNA genômico é replicado e os genes γ são expressos. Em (h) as proteínas do capsídeo são montadas, o DNA do vírus é empacotado nos capsídeos vazios e o tegumento é colocado. A partícula viral então brota da membrana nuclear e assim adquire seu próprio envelope. Em (i) os vírus envelopados deixam a célula.

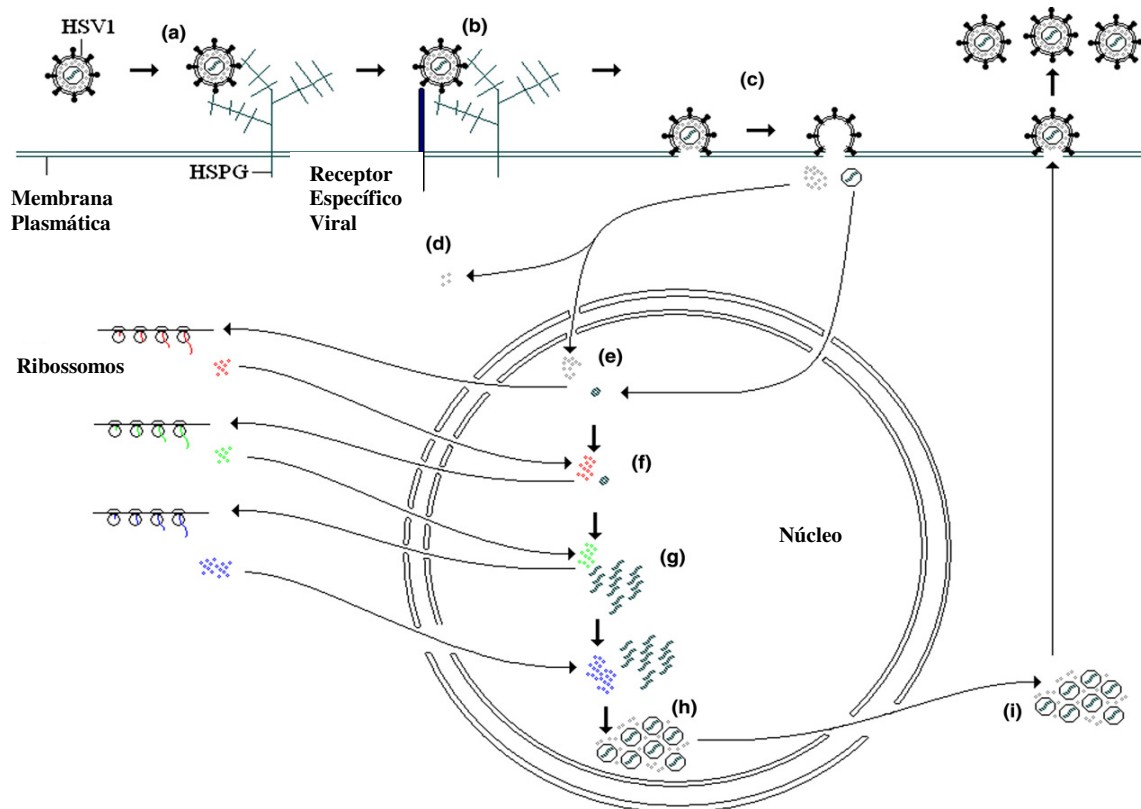


FIGURA 4 - CICLO DE VIDA DO HSV-1

Fonte: ITZHAKI; WOSNIAK (2006)

Após a entrada na célula, o tegumento e o nucleocapsídeo são liberados no citoplasma e uma das proteínas do tegumento pára a síntese protéica da célula hospedeira (KWONG; FRENKEL, 1987). O nucleocapsídeo se move em direção ao núcleo e é desmontado, liberando o DNA em seu interior. O genoma se torna circular. Logo após, uma proteína do tegumento – quando combinada com duas outras proteínas da célula hospedeira – inicia a expressão gênica viral (TAL-SINGER *et al.*, 1997). As proteínas produzidas são denominadas de α e muitas delas estão envolvidas na regulação gênica viral. Os genes α iniciam a expressão dos β , muitos dos quais são requeridos para o processo de replicação do genoma viral na próxima etapa. Os últimos a serem expressos são os genes γ , os quais codificam as proteínas estruturais do vírus. Quando uma quantidade suficiente de proteína viral está disponível, os capsômeros são então montados, o DNA é empacotado nos capsídeos vazios e as proteínas do tegumento são ligadas à superfície exterior do capsídeo. As partículas virais, então, brotam do núcleo e adquirem seus envelopes (HUTCHINSON; JOHNSON, 1995).

As partículas virais envelopadas então egressam da célula por dois mecanismos propostos: uma sucessão de brotamentos ocorre e a partícula viral acaba por viajar saindo da membrana nuclear, passando pelo retículo endoplasmático e aparelho de Golgi e por fim a superfície celular; a outra hipótese consiste na passagem do capsídeo pela dupla membrana nuclear, adquirindo um envelope na primeira passagem e deixando-o para trás quando da passagem pela membrana exterior do núcleo, produzindo capsídeos nus, os quais obterão seus envelopes no momento do brotamento pela membrana celular ou por estruturas citoplasmáticas (como aparelho de Golgi ou retículo endoplasmático) antes de serem transportados à superfície celular (HUTCHINSON; JOHNSON, 1995).

Uma infecção latente se inicia do mesmo modo que uma produtiva, entretanto, a cascata de expressão gênica não acontece. De fato, a expressão dos genes está limitada e nenhuma partícula viral é produzida. Sob estímulos apropriados, o vírus se torna capaz de reativar e iniciar o ciclo de vida produtivo (ITZHAKI; WOSNIAK, 2006).

O estado de latência pode ser dividido em três estágios: estabelecimento, manutenção e reativação. O HSV-1 estabelece latência em gânglios sensoriais. Do sítio inicial de infecção, o vírus é movido ao longo dos axônios em uma conduta retrógrada para os neurônios ganglionares. Uma vez no núcleo de um neurônio ganglionar, o DNA viral se torna circular e se associa a nucleossomas celulares (DESHMANE; FRASER, 1989). Esta formação estabiliza o material genético e ainda o torna metilado (YOUSSOUFIAN *et al.*, 1982).

A fase de manutenção da latência envolve a repressão do DNA viral em uma forma circular e nucleossoma-associada, a qual o previne de uma possível lise (ITZHAKI; WOSNIAK, 2006).

Na fase de reativação, o vírus deixa seu estado de latência e inicia a fase produtiva de infecção. Estímulos como injúria neuronal, corticosteróides e hipotermia são algumas das causas de quebra de latência. Desta forma, novas partículas virais são então formadas (ITZHAKI; WOSNIAK, 2006).

A expressão gênica no estado de latência fica limitada a um único gene – o gene que codifica a transcrição associada à latência (LAT) (WAGNER *et al.*, 1988). LATs são moléculas de RNA que estão abundantemente presentes nos neurônios infectados. Estes transcritos não são aparentemente traduzidos, entretanto, seus

estados funcionais são representados pela presença de moléculas de RNA (ITZHAKI; WOSNIAK, 2006).

Os vírus de forma geral são transmitidos aos indivíduos de acordo com determinados fatores:

- Exposição ao agente infeccioso de um indivíduo sintomático ou assintomático para uma determinada doença;
- Tamanho do inóculo;
- Local de exposição ao vírus;
- Tipo viral;
- Existência de cepas mais virulentas;
- Aptidão viral;
- Barreiras físico-químicas do receptor (pH, estrato córneo, muco, etc.);
- Susceptibilidade à ocorrência de reativação;
- Fatores genéticos do hospedeiro (susceptibilidade das células hospedeiras ao vírus ou deficiências no sistema imune) (SACKS *et al.*, 2004).

Para que o vírus tenha uma propagação bem sucedida, ele precisa sobreviver e se adaptar às defesas de seu hospedeiro. E estas duas situações podem ser alcançadas por uma rápida replicação, altas cargas virais, infecções e doença agudas. Tudo isso leva o hospedeiro a desenvolver um processo imune sólido frente ao agente infectante. Entretanto, os vírus podem estabelecer cronicidade, altas cargas virais associadas a respostas imunes não tão eficientes, como por exemplo, os vírus da hepatite B e C (SACKS *et al.*, 2004).

1.4 Antivirais utilizados no tratamento de HSV

Um dos maiores empecilhos à descoberta de novas substâncias antivirais é, basicamente, o efeito citotóxico que produzem. Esta dificuldade está relacionada à total dependência do vírus por sua célula hospedeira, pois estes microrganismos não possuem metabolismo próprio, muito menos conseguem se replicar de forma independente (SPINOSA *et al.*, 2002).

Quando no meio extracelular, as partículas virais são metabolicamente inertes e neste momento não desempenham funções biossintéticas. Por isso, precisam adentrar as células do hospedeiro (animal, vegetal ou mesmo bacterianas) e utilizar a maquinaria delas para sobreviver (SPINOSA *et al.*, 2002).

Atualmente, sabe-se que o principal aspecto dentro do ciclo de vida do HSV no qual uma terapia antiviral pode desenvolver-se com sucesso é no processo de replicação do DNA viral. Esta fase consiste no principal alvo de um pequeno grupo de drogas análogas de nucleosídeos (FIGURA 5), no qual está incluído o aciclovir (ACV). Estes análogos de nucleosídeos têm como alvo duas enzimas virais: a Timidina quinase (TK) e a DNA polimerase; eles aproveitam-se das diferenças entre a replicação celular e viral para colocar em ação seus efeitos antivirais seletivos (COEN, 1996).

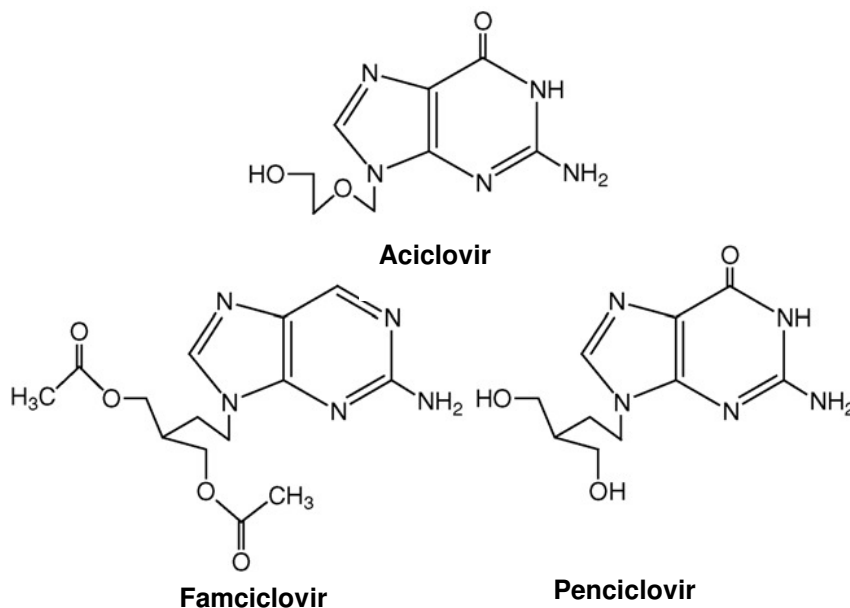


FIGURA 5 - ESTRUTURA MOLECULAR DAS DROGAS ACICLOVIR, FAMCICLOVIR E PENCICLOVIR

Fonte: <http://pages.unibas.ch/mdpi/ecsoc-3/a0034/Chen.gif>

A respeito do tratamento, drogas com ação efetiva contra o herpes, como o aciclovir, ganciclovir, valaciclovir (éster de L-valina do aciclovir), penciclovir, famciclovir (uma pró-droga do penciclovir com uma biodisponibilidade oral maior) e a vidarabina estão atualmente disponíveis para utilização no tratamento da doença. Dentre estas o aciclovir é o fármaco de maior uso corrente nas infecções de HSV,

seguida do penciclovir e famciclovir. Além do mais, deve-se considerar que estes medicamentos são caros e muitos pacientes com recidivas podem não estar aptos a arcar com o ônus de um tratamento longo (HAMMER; INOUE, 1997).

O aciclovir (ACV) ou acicloguanosina é um inibidor potente e seletivo da replicação do DNA dos herpesvírus. Sua ação antiviral é mediada pelo aciclovir trifosfato (ACV-TP) que inibe três etapas do ciclo replicativo:

- 1) o ACV-TP inibe competitivamente a utilização de GTP (guanosina trifosfato) pela DNA polimerase viral;
- 2) o ACV-TP termina o alongamento da fita de DNA do HSV quando incorporado como um substituto análogo da guanosina;
- 3) a DNA polimerase viral é inativada pela ligação ao ACV-TP no molde do disparador do DNA (PAGE *et al.*, 2004).

As DNA polimerases do HCMV e do EBV são menos sensíveis ao efeito inibidor de ACV-TP do que aquelas presentes no herpesvírus e varicela zoster vírus contribuindo, em parte para a ineficácia do ACV no tratamento das infecções por CMV e EBV. Os efeitos seletivos de ACV na replicação viral representam efeitos mínimos na replicação do DNA celular devido a dois fatores: ele é seletivamente concentrado nas células infectadas pela ação catalítica da enzima timidina quinase (TK) codificada pelo vírus; e a molécula antiviral ativa, ACV-TP, tem maior afinidade pelo HSV do que a DNA polimerase celular, resultando em inibição seletiva da enzima viral (PAGE *et al.*, 2004).

Embora o aciclovir seja parcialmente absorvido pelo trato gastrointestinal (menos de um terço), pode ser administrado via oral. Utiliza-se o sal sódico para a administração por via endovenosa. Este é amplamente distribuído pelo organismo, sendo sua concentração no líquido cefalorraquidiano correspondente a 50% da encontrada no plasma. A excreção do fármaco acontece parcialmente pelos rins por filtração glomerular e secreção tubular (SPINOSA *et al.*, 2002).

A toxicidade destes análogos de nucleosídeos tem sido amplamente relatada devido ao aumento de seu uso. O aciclovir e o ganciclovir ainda podem levar à neurotoxicidade e isso ocorre particularmente nos casos de disfunção renal (ERNST; FRANEY, 1998). Desta forma, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de novos agentes antivirais que possam substituir ou mesmo complementar a ação dos análogos de nucleosídeos (ZHU *et al.*, 2005).

Outras moléculas antivirais poderiam ser de grande relevância para o tratamento das lesões epiteliais causadas pelo HSV (HOLLAND; SCHWARTZ, 1999). Cepas de herpesvírus droga-resistentes freqüentemente se desenvolvem durante o tratamento terapêutico (WHITLEY; KIMBERLIN, 1998). Resistências relacionadas aos análogos de nucleosídeos podem ocorrer através de mutações tanto na Timidina Quinase (TK) quanto na DNA polimerase do vírus (WEBER; CINATL, 1996). Portanto, novos agentes antivirais exibindo diferentes mecanismos de ação estão sendo requisitados. Cepas ACV-resistentes foram recentemente encontradas em paciente imunocomprometidos (COEN, 1996).

1.5 Atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos representam um complexo grupo de macromoléculas possuidoras de uma vasta gama de propriedades biológicas importantes em se tratando de terapêutica, amplamente conhecidas por afetar o crescimento de alguns vírus animais (SHANNAN, 1984).

Um dos mecanismos de ação contra o vírus do herpes proposto para as carragenanas (um polissacarídeo naturalmente sulfatado obtido a partir de algas vermelhas – *Rhodophyta*) se apresenta de forma diferente do mecanismo inibição da adsorção viral à superfície celular. Utilizando vírus marcado radioativamente com [³⁵S]-metionina, verificou-se que houve inibição da replicação na presença de carragenana, quando adicionada ao meio até uma hora antes da infecção com o HSV-1, mas que não existia uma interferência sobre a adesão ou penetração do vírus à célula. Foi então proposto que os polissacarídeos seriam internalizados na presença do vírus e que exerceriam a sua atividade antiviral através da inibição da expressão do genoma por interação com ácidos nucleicos (GONZÁLES *et al.*, 1987^{a, b}).

Já há alguns anos, as propriedades antivirais de polissacarídeos sulfatados têm sido reconhecidas por muitos autores (ANDERSSON *et al.*, 1979). Recentemente, ensaios de atividade antiviral de um grande número de compostos retirados de algas marinhas e cianobactérias como *Acanthophora spicifera* (DUARTE *et al.*, 2004), *Gracilaria corticata* (MAZUMDER *et al.*, 2002), *Bostrychia montagnei* (DUARTE *et al.*, 2001), *Spirulina platensis* (LEE *et al.*, 2001), *Sargassum*

horneri (PREEPRAME *et al.*, 2001), *Monostroma latissimum* (LEE *et al.*, 1999), *Ulva lactuca* (IVANOVA *et al.*, 1994), levaram à identificação de um grande número de polímeros de carboidratos com potentes efeitos inibitórios contra muitos vírus animais, incluindo importantes agentes patogênicos humanos (FRANZ *et al.*, 2000). Conseqüentemente, o potencial antiviral dos polissacarídeos sulfatados extraídos de algas se torna consideravelmente interessante, apesar da relação estrutura-atividade ainda não estar totalmente elucidada (GOSH *et al.*, 2004).

Um inibidor de transcriptase reversa, extraído e purificado da alga vermelha *Schizymenia pacifica*, com características sugestivas de um polissacarídeo sulfatado membro da família das λ -carragenanas, inibiu seletivamente o vírus HIV. Quando células MT-4 foram tratadas com mais de 10^4 unidades inibitórias do extrato da alga marinha por mL, NAKASHIMA *et al.* (1987) observaram inibição significativa da síntese de antígenos virais em infecção *in vitro* com o vírus HIV. Da mesma forma, a glucuronogalactana sulfatada extraída de *S. dubyi* inibiu a replicação *in vitro* do HIV (BOURGOUGNON *et al.*, 1996).

CÁCERES *et al.* (2000) reportaram que polissacarídeos extraídos de *Stenogramme interrupta* apresentaram atividade antiviral efetiva contra diversas cepas de vírus herpes simplex. A atividade anti-herpética destes polissacarídeos foi similar à encontrada previamente para κ /i e λ -carragenanas isoladas de *Gigartina skottsbergii* (CARLUCCI *et al.*, 1997).

BUCK *et al.* (2006) relataram que carragenanas naturalmente sulfatadas extraídas de algas vermelhas se mostraram potentes inibidores contra uma vasta gama de infecções sexualmente transmissíveis causadas pelo papilomavírus humano. Além de apresentarem poder inibitório contra o HSV e contra algumas cepas de HIV, os papilomavírus humanos genitais mais mais susceptíveis a essa carragenana, que tem poder inibitório mesmo quando utilizada uma CI50 abaixo da faixa de ng/mL. Elas atuam primeiramente prevenindo a ligação do papilomavirus com a célula (interação com o heparan sulfato). Alguns estudos investigam seu uso tópico como virucida usado contra HIV e HSV, entretanto, esse polissacarídeo apresenta maior efetividade contra o HPV em testes sobre o cultivo celular.

Os polissacarídeos sulfatados parecem exercer atividade anti-herpética por meio de diferentes mecanismos de ação: carragenanas da alga *Stenogramme interrupta* apresentaram uma CI50 entre 0,65 e 9,33 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ com indícios de que a atividade estaria sendo exercida na etapa de adsorção, visto que não apresentaram

atividade virucida e foram desprovidas de qualquer ação quando adicionadas ao meio após a adsorção viral (CÁCERES *et al.*, 2000). Diferentes carragenanas (tipo λ , κ /I e μ /V) apresentaram atividade contra os vírus HSV-1 e HSV-2 entre 0,4 e 3,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e, embora o principal alvo para a ação antiviral tenha sido a etapa de adsorção, a fração λ -carragenana mostrou atividade virucida e ação antiviral quando adicionada ao meio após a etapa de adsorção (CARLUCCI *et al.*, 1999).

Galactanas sulfatadas da alga *Gracilaria corticata* foram efetivas contra HSV-1 e HSV-2 a concentrações entre 0,19 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, apresentando atividade virucida somente a concentrações 10 a 1.000 vezes maiores que a CI50, exercendo a sua ação durante o período de adsorção (MAZUMDER *et al.*, 2002).

TALYSHINSKY *et al.* (2002) relataram que microalgas vermelhas inibiram a produção de retrovírus (*murine sarcoma virus*) assim como a transformação celular causada por ele. O efeito inibitório mais efetivo desses polissacarídeos ocorreu tanto contra transformação celular quanto produção viral. Isto pôde ser observado quando o polissacarídeo foi adicionado duas horas antes ou no momento da infecção. Ele ainda apresentou efeito inibitório da transformação celular quando colocado em contato com as células após a adsorção viral, mas esse efeito não foi tão marcante quando se adicionado no período anterior à adsorção.

CHATTOPADHYAY *et al.* (2007) analisando frações isoladas da alga *Grateloupia indica* observaram potente atividade anti-HSV em seus experimentos. A concentração inibitória 50%, que variou entre 0,12 a 1,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ficou muito abaixo da concentração citotóxica 50% (valores maiores que 850 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estas frações foram consideradas pelos autores antivirais efetivos contra esse vírus quando adicionadas ao cultivo durante o período de adsorção, além de terem apresentado atividade anticoagulante muito baixa. Os grupamentos sulfatos desse polissacarídeo (essenciais para a atividade antiviral) foram localizados em sua maioria nos carbonos 2/6 da ligação α -(1 \rightarrow 4) e C4/6 da ligação α -(1 \rightarrow 3), presentes nos resíduos de galactopirranose.

ONO *et al.* (2003) verificaram a ação antiviral de galactomananas quimicamente sulfatadas de sementes de *Mimosa scabrella* e *Leucaena leucocephala* contra os vírus da dengue e da febre amarela *in vivo* e *in vitro*.

Entretanto, sabe-se que o rendimento após extração dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é menor quando comparado ao rendimento de galactomananas extraídas de sementes de plantas (que gira em torno de 30%). Por

isso, processos químicos de sulfatação destes polissacarídeos possibilitariam a produção destas moléculas em grande escala para a utilização na indústria farmacêutica.

Pela já comprovada resistência que algumas linhagens virais vêm apresentando a alguns compostos existentes no mercado, nota-se que é importante que sejam realizadas pesquisas na busca de novos princípios ativos que possam ser utilizados contra o herpes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Obter derivados sulfatados de galactomananas extraídas de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena) e de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar comercial) a serem empregados em testes de atividade antiviral contra o vírus HSV-1 e determinar a estrutura química parcial para correlacionar dados de estrutura/atividade biológica.

2.2 Específicos:

- Purificar a galactomanana previamente extraídas de sementes de leucena e uma amostra de guar comercial por filtração em membrana;
- Derivatizar as diferentes galactomananas por sulfatação;
- Analisar o grau de sulfatação por métodos químicos e físico-químicos.
- Avaliar a toxicidade dos derivados sulfatados de galactomananas de leucena e guar sobre o cultivo celular.
- Avaliar a propriedade antiviral *in vitro* dos polissacarídeos nativos e modificados contra o vírus HSV –1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de galactomamanas

A amostra de galactomanana de leucena utilizada para posterior sulfatação foi cedida pela Prof.^a Maria Rita Sierakowski, a qual já havia sido extraída de sementes de *L. leucocephala* coletadas em Curitiba – PR, no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Em estudo anterior a amostra sofreu inativação enzimática em água fervente por 30 minutos e logo após foram trituradas em liquidificador em velocidade reduzida. Sofreram após esses procedimentos uma extração aquosa em temperatura ambiente até exaustão, sob agitação.

Uma segunda amostra de galactomanana derivatizada de leucena também cedida pela Prof.^a Maria Rita Sierakowski foi utilizada nos experimentos deste estudo. Essa amostra já havia sido sulfatada em estudos prévios, utilizando-se técnicas iguais às empregadas na sulfatação das amostras do presente trabalho.

A amostra de goma guar foi igualmente cedida pela Prof.^a Maria Rita Sierakowski, a qual foi adquirida do Herbarium Laboratório Botânico Ltda.

Os polissacarídeos receberam as seguintes denominações: GN - galactomanana nativa de guar; GS – galactomanana sulfatada de guar (foi sulfatada e resulfatada); LN – galactomanana nativa de leucena; LSA – galactomanana sulfatada A de leucena, sintetizada no presente estudo (foi sulfatada e resulfatada); LSB – galactomanana sulfatada B de leucena.

3.2 Purificação dos polissacarídeos

As galactomamanas de sementes de leucena e de guar comercial foram solubilizadas, centrifugadas a 8000 rpm por 15 min e filtradas por membranas de 3, 0,8, 0,4 e 0,22 μm e concentradas a 50°C sob pressão reduzida em rotaevaporador. Foi adicionado NaCl para concentração final de 0,1M, seguindo-se de precipitação do polissacarídeo com etanol comercial (2 volumes). O precipitado foi lavado 2 vezes com etanol comercial e 1 vez com acetona PA. O material foi centrifugado em um segundo momento e seco em estufa a 40°C. Esta etapa foi realizada no

Departamento de Química-UFPR, em colaboração com a Prof.^a Maria Rita Sierakowski.

3.3 Métodos Gerais

As dosagens de proteínas foram realizadas através do método de Hartree (1972) a 650nm, as de açúcar total através do método de DUBOIS *et al.* (1956) a 490nm em um espectrofotômetro Biospectro SP - 220. A determinação do grau de sulfatação foi feita por método turbidimétrico por precipitação com cloreto de bário (DODGSON; PRICE, 1962).

A padronização das dosagens foi feita através da confecção de uma curva padrão, utilizando albumina bovina como padrão para a dosagem de proteína e Manose:Galactose na proporção de 1,4:1,0 como padrão, baseada na análise de GLC feita por ONO *et al.* (2003) para dosagem de açúcar total de leucena e na proporção de 1,9:1,0, baseada na análise de GLC feita por LUCYSZYN (1994) para o guar. Para as análises de sulfato o padrão utilizado foi sulfato de sódio em HCl 1N. A partir das respectivas curvas padrões, pôde-se chegar aos percentuais de proteína e açúcar total dos derivados nativos e sulfatados. Para o cálculo do grau de sulfatação (DS) o seguinte modelo foi utilizado:

$$DS = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de mols de enxofre}}{\text{n}^{\circ} \text{ de mols de unidades monossacarídicas}}$$

Para a determinação da composição monossacarídica, amostras dos polissacarídeos (10mg) foram hidrolisadas em ácido trifluoracético (TFA) 1M, durante 5h, em banho de água fervente (ADAMS, 1965) em uma panela de banho-maria CTR - 245 CIENTEC, 110v. Os monossacarídeos produzidos foram reduzidos com NaBH₄, neutralizados com resina LEWATIT S-100 (H⁺) e lavados com metanol; os alditóis, após secos, foram acetilados em piridina/anidrido (1/1) durante 15h (à temperatura ambiente) e extraídos com clorofórmio. Os acetatos de alditóis foram analisados por GLC (WOLFROM; THOMPSON, 1963) em um cromatógrafo líquido-gasoso Varian Prostar 230. Esta etapa foi realizada no Departamento de Química -

UFPR, em colaboração com a Prof.^a Maria Rita Sierakowski, e no Departamento de Bioquímica – UFPR, onde se encontra o aparelho utilizado para a leitura.

3.4 Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho das amostras nativas e sulfatadas foram obtidos em espectrômetro BOMEM, Hartmann & Baum – MB (Departamento de Química – UFPR, em colaboração com a Prof.^a Maria Rita Sierakowski), em pastilhas de KBr.

3.5 Obtenção dos derivados sulfatados dos polissacarídeos a serem utilizados em testes de atividade antiviral

Os derivados sulfatados foram sintetizados conforme descrito por O'NEILL (1955), para isso, 3g de polissacarídeo foi dissolvido em piridina (500mL), mantendo-se o sistema a 25°C sob agitação (12h) até que uma suspensão fina se formasse. O sistema foi resfriado a 4°C em cuba de gelo e o ácido clorossulfônico (40mL) foi adicionado aos poucos e lentamente devido à alta reatividade dos reagentes, seguido de piridina (100mL) e formamida (100mL), mantendo o sistema sob agitação constante e resfriamento por mais 24h (em geladeira). O sistema foi neutralizado com solução saturada de NaHCO₃, dialisado contra água corrente (120h) e em água destilada (48h) em sistema fechado com 3 trocas de água. As amostras foram centrifugadas (8.000 rpm, 25 min) em centrífuga CINTEC (CT - 6000R) e filtradas em membrana de 0,22µm (Millipore®). As soluções assim obtidas foram concentradas por rotaevaporação a 50°C (rotaevaporador RE 120 BÜCHI), congeladas em freezer Ultra Freezer AL 250v - 80 (American Lab.) e depois liofilizadas (liofilizador Micromodulyo Freeze Dryer - Thermo Electron Corporation).

3.6 Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de *L. leucocephala* e guar em células VERO

A determinação da toxicidade *in vitro* foi feita conforme descrito por DENIZOT e LANG (1986), através da quantificação do número de células viáveis com o brometo de 3-(4'5'-dimetil-tiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazólio (MTT), sendo a leitura realizado em espectrofotômetro (Thermo Plate - leitora para microplacas TP-reader) de ELISA ($\lambda = 540$ e 630nm). As células VERO utilizadas para o experimento foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Diagnóstico Marcus Enrietti – Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB – PR) e estavam na passagem 182.

Foram utilizadas placas de 96 poços (uma placa por amostra) com uma quantidade de 7.000 células por poço. Para tanto, garrafas de cultivo celular T25 foram tripsinizadas, homogeneizadas e a contagem celular total das garrafas foi efetuada. Com base nela, pode-se então colocar em cada poço uma quantidade padrão de células nas placas de 96 poços. Foi adicionado 0,2mL de meio de cultivo Eagle por poço, com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 10% de meio triptose fosfato (TPB) e antibióticos (enrofloxacina, penicilina G potássica, estreptomicina e anfotericina B). Essas placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a temperatura de 37°C por 48 horas (Thermo Electron Corporation HEPA Class 100 – Forma Series II), para o crescimento da monocamada celular e o fechamento do tapete celular em cada poço.

As células foram acompanhadas diariamente, por meio de microscópio invertido (BIOVAL XDS - 1B), com o intuito de verificar o correto estabelecimento da monocamada. Assim que ela se fechou, pode-se então realizar a segunda etapa do teste.

Foram preparadas soluções dos polissacarídeos sulfatados e nativos a uma concentração de 5mg/mL, através de solubilização em água destilada por 12 horas (*overnight*). Após esse procedimento, foram filtrados em membrana de 0,22 μ m (Millipore®) em fluxo laminar VECO Manometer MM 200 600, para retirar qualquer possível contaminante a fim de esterilizar a amostra. A partir desta concentração inicial foram realizadas diluições dos polissacarídeos em meio de cultivo sem soro fetal bovino, com 10% de TPB e antibióticos. As diluições seriadas estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2 - DILUIÇÕES SERIADAS DOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS E SULFATADOS DE LEUCENA E GUAR

Tubo	Concentração Final (µg/poço)
Tubo 1	125,0
Tubo 2	62,5
Tubo 3	31,25
Tubo 4	15,625
Tubo 5	7,812
Tubo 6	3,906
Tubo 7	1,53
Tubo 8	0,976
Tubo 9	0,488
Tubo 10	0,245

Fonte: O autor (2008)

Após o preparo das diluições dos polissacarídeos, estes foram adicionados às placas contendo o tapete celular completamente fechado de duas maneiras distintas: mimetizando um processo de adição do polissacarídeo durante uma possível adsorção viral e após o período de adsorção viral:

a) Para mimetizar a adição dos polissacarídeos antivirais durante a adsorção viral, o seguinte procedimento foi adotado. Dentro de um fluxo laminar (VECO Manometer MM 200 600), retirou-se da placa o meio de cultivo velho, limpando-a com papel toalha. A etapa seguinte consistiu na adição de 50µL das diferentes diluições dos polissacarídeos por coluna. As placas foram incubadas por um período de uma hora em estufa de CO₂ (5%) a 37°C (Thermo Electron Corporation HEPA Class 100 – Forma Series II). Depois desse intervalo de tempo, o polissacarídeo foi retirado e adicionou-se às células de cada poço 200 µL de meio de manutenção com 2% de Soro Fetal Bovino, 10% de TPB e antibióticos. As placas foram então incubadas novamente, nas mesmas condições anteriormente citadas, por 72 horas e depois desse período, foram realizadas as respectivas leituras em espectrofotômetro de ELISA (Thermo Plate TP – Reader).

b) Para tentar reproduzir a adição de polissacarídeo antiviral após o período de adsorção viral e entrada na célula hospedeira, o seguinte procedimento foi adotado. Dentro de um fluxo laminar (VECO Manometer MM 200 600), retirou-se da placa o meio de cultivo velho, limpando-a com papel toalha. A etapa seguinte

consistiu na adição de 150 μ L de meio de manutenção com 2,7% de soro fetal bovino (para manter a mesma concentração de soro utilizada no experimento anterior, visto que a esse meio ainda seriam adicionadas as diferentes diluições de polissacarídeos), 10% de TPB e antibióticos em cada poço. Em cima deste meio de cultura, foram adicionados 50 μ L das diferentes diluições de polissacarídeos. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C por 72 horas e depois a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de ELISA.

A seguir, pode ser visualizado um esquema de como foram colocadas as diluições dos diferentes polissacarídeos nas placas de 96 poços (FIGURA 6). Para que a leitura dentro do aparelho de ELISA seja realizada, convencionou-se deixar uma coluna inteira como controle negativo a fim de zerar o aparelho (branco) e mais uma coluna inteira como controle positivo com a finalidade de mensurar a quantidade de células que morreram pelo próprio envelhecimento e não pela adição do polissacarídeo ao meio. As outras colunas foram divididas entre as diluições, de acordo com o número do tubo descrito na Tabela 2. Respeitou-se a ordem decrescente da numeração dos tubos com o intuito de iniciar-se a inoculação dos polissacarídeos da maior diluição para a menor, a fim de evitar a provável contaminação dos poços com diluições maiores.

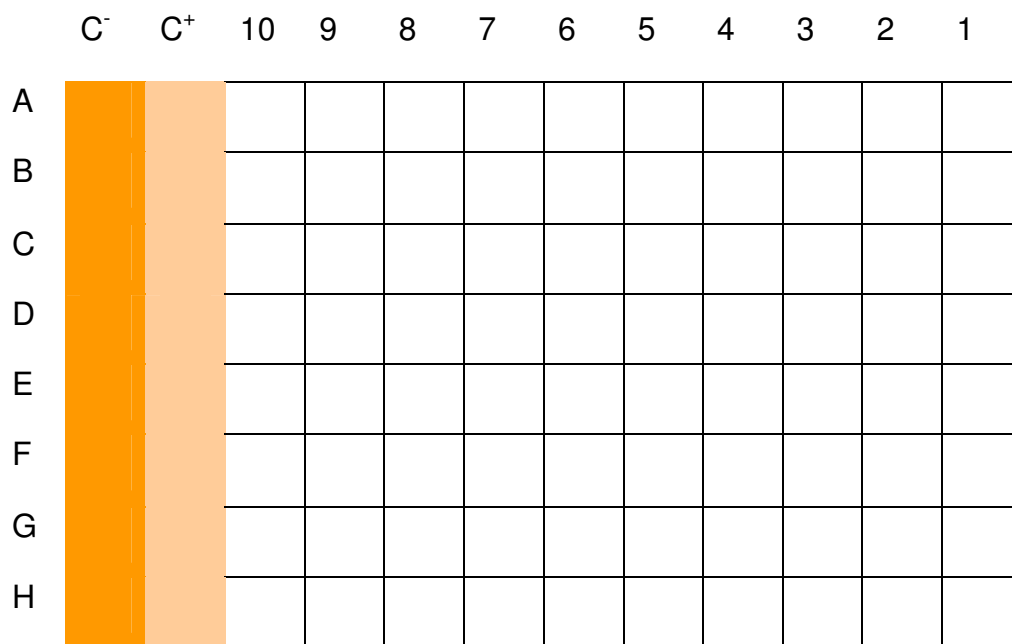


FIGURA 6 - PLACA DE 96 POÇOS UTILIZADA PARA O TESTE DE CITOTOXICIDADE FRENTE A DIFERENTES DILUIÇÕES DE POLISSACARÍDEOS COM PROPRIEDADES ANTIVIRAIS

Fonte: O autor (2008)

Após o período de incubação de 72 horas, o meio de manutenção velho foi retirado de todas as placas e a elas foram adicionados 50 µL de MTT diluído em meio de cultura em cada poço das diluições e no controle positivo. Elas foram incubadas por mais três horas, para que as células incorporassem o MTT e o metabolizassem a cristais de formazan (que possuem coloração azul escura), pois somente células vivas conseguem realizar esse metabolismo. Após a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), uma reação com a emissão de cor ocorreu, a qual pôde ser medida espectrofotometricamente através da leitura em aparelho de ELISA. Após a adição de DMSO, as microplacas foram agitadas manualmente e posicionadas no aparelho (que ainda realiza uma pequena agitação contínua por 60 segundos). A faixa de comprimento de onda utilizada para a leitura foi de 540 a 630nm.

Todo esse procedimento teve como objetivo a determinação da concentração citotóxica 50% (CC50), capaz de reduzir em 50% o número de células viáveis.

Para determinar se houve diferença significativa no número de células VERO viáveis em relação ao controle sem polissacarídeos, aplicou-se o teste *t* de Student, com nível de significância de 0,05 (BOLTON, 1990).

3.7 Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de *L. leucocephala* e guar contra o HSV-1 *in vitro*

A cepa do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) do American Type Culture Collection foi gentilmente cedida pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti - SEAB – Curitiba - PR. A determinação do potencial antiviral dos polissacarídeos sulfatados *in vitro* contra a replicação do HSV-1 se baseou na inibição do efeito citopático vírus induzido (DAMONTE *et al.*, 1996), através da redução na contagem do número de unidades formadoras de placas (UFP) em placas de 24 poços infectadas com aproximadamente 100 unidades formadoras de placas (UFP) por poço (DAMONTE *et al.*, 1996; TULIO, 1998) e polissacarídeos em diferentes concentrações. As contagens foram realizadas em microscópio invertido (Bioval XDS - 1B) após coloração com cristal violeta.

Para determinar a etapa do ciclo de replicação viral em que os polissacarídeos apresentariam atividade antiviral, foram realizados dois experimentos:

a) Determinação da atividade antiviral durante o período correspondente à adsorção viral: após o fechamento da monocamada de células VERO, os polissacarídeos foram adicionados em diferentes concentrações (200µL/poço; 0,245-125 µg/poço, com aproximadamente 100 UFP/poço, n = 12 poços). A microplaca foi incubada em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por um período de 1,5h. Após esse intervalo, os polissacarídeos foram retirados e os poços preenchidos com meio de manutenção contendo 5% de soro fetal bovino e metilcelulose 0,9%. As microplacas foram novamente incubadas em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 72h.

b) Determinação da atividade antiviral após o período correspondente à adsorção viral: após o fechamento da monocamada de células VERO, 200 µL de meio de cultura contendo aproximadamente 100UFP foram adicionados por poço e a placa foi incubada em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por um período de 1,5h. Após esse intervalo, o meio de cultura foi retirado e os polissacarídeos adicionados em diferentes concentrações (200µL/poço, 0,245-125 µg/poço, n = 12 poços). Posteriormente, os poços foram preenchidos com meio de manutenção contendo 5% de soro fetal bovino e metilcelulose 0,9%. As placas foram incubadas novamente em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 72h.

Para as amostras de galactomananas de leucena nativa e sulfatada foi realizado um único experimento em três blocos (três placas contendo amostra nativa e sulfatada com quatro unidades cada). Já para a goma guar foi feita uma placa somente para ambas galactomananas nativa e modificada.

Foram adicionados aos poços do controle positivo de todas as placas somente suspensão viral e meio de manutenção. Após a adsorção, foram colocados meio de cultivo e metilcelulose, nas mesmas condições que os demais poços. Com o controle positivo, pôde-se monitorar o efeito citopático viral e compará-lo aos poços em que o polissacarídeo foi adicionado, a fim de comprovar o efeito antiviral das galactomananas estudadas.

Para determinar se houve diferença significativa no número de UFP encontradas em relação ao controle sem polissacarídeos, aplicou-se o teste *t* de Student, com nível de significância de 0,05 (BOLTON, 1990).

3.8 Análises estatísticas

O teste t de Student verifica se há diferença estatisticamente significativa entre a média de absorvância dos poços do controle positivo (onde há 100% de viabilidade celular, pois não há adição de polissacarídeos) e dos poços contendo as amostras. Para um número de graus de liberdade ($n_1 + n_2 - 2$) de 14, o valor de t tabelado crítico para nível de significância de 0,05 é igual a 2,14. Valores de t calculado que se apresentem iguais ou maiores que o t crítico ou tabelado indicam diferença estatisticamente significativa entre as médias do controle e da amostra analisada (BOLTON, 1990).

Os valores de F (teste de Fisher) foram calculados para definir se existiria diferença entre as variâncias do controle e das amostras. O F tabelado, para um nível de significância de 0,05 e com 7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador, seria de 3,79, e, valores acima desse F tabelado seriam indicativo de diferença estatisticamente significativa entre as variâncias. Nesse caso, o valor de t crítico levaria em consideração essa diferença.

Para os experimentos de atividade anti-viral, o teste t de Student verifica se há diferença estatisticamente significativa entre a média de número de UFP dos poços do controle positivo (onde há aproximadamente 100 UFP/poço, pois não há adição de polissacarídeos) e dos poços contendo vírus e as amostras. Para um número de graus de liberdade ($n_1 + n_2 - 2$) de 5, o valor de t tabelado crítico para nível de significância de 0,05 é igual a 2,57 e para um número de graus de liberdade de 19, o valor de t tabelado crítico é igual a 2,09. Valores de t calculado que se apresentem iguais ou maiores que o t crítico ou tabelado indicam diferença estatisticamente significativa entre as médias do controle positivo e da amostra analisada (BOLTON, 1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação dos polissacarídeos e obtenção dos derivados sulfatados

Ao final do processo de purificação por meio de solubilização, centrifugação, filtração por membrana, rotaevaporação, precipitação e secagem, a galactomanana nativa de sementes de leucena teve um rendimento final de 66,3%. Para a amostra de goma guar nativa, obteve-se um rendimento final ligeiramente inferior quando comparado à leucena de aproximadamente 57,0%.

Após a reação de sulfatação de leucena foram solubilizados 3,05g em 500mL piridina, e deste total, obteve-se um rendimento após o procedimento de purificação de 35,0%. A amostra de goma guar apresentou após o processo de liofilização um percentual de 36,5%. Os percentuais apresentados referem-se ao rendimento após a filtração e centrifugação do material solubilizado para a retirada do material insolúvel.

Tanto os derivados sulfatados de leucena quanto de guar foram liofilizados. Portanto, não passaram pelo processo de precipitação com etanol. Essa metodologia foi realizada, pois um piloto de precipitação com etanol foi realizado e as galactomananas não sedimentaram. Para evitar que as amostras fossem degradadas elas sofreram liofilização por não ter sido estudada a sua estabilidade térmica.

Pode-se verificar que houve bom rendimento destas amostras nativas assim como das sulfatadas ao fim dos processos de purificação, visto que boa parte da amostra inicial foi recuperada após todo o processo. ONO (2004) obteve rendimento bruto de sua amostra de leucena em torno de 17% e após a purificação de 13,3%. Nesse mesmo estudo galactomananas extraídas de sementes de *Cassia fastuosa* renderam antes do processo de purificação 31,4% e 19,3% após a purificação realizada por centrifugação e filtração por membrana de 3 μ m. BUCKERIDGE, DIETRICH, MALUF (1987) obtiveram rendimentos de galactomananas de sementes de *L. leucocephala* entre 9,7 e 15,7% a partir do material purificado.

TULIO (1998) em seus experimentos com galactanas extraídas da alga *Bostrichia montagnei* obteve rendimentos em torno de 11% em relação à alga seca, configurando um valor inferior ao obtido neste estudo. É possível se dizer que os

rendimentos finais das amostras analisadas no presente trabalho foram bons, o que torna estes polissacarídeos moléculas interessantes para serem utilizadas na síntese de antivirais em escala industrial. Além disso, poderia se inferir que há diferença significativa quando as duas fontes de açúcares sulfatados são comparadas, demonstrando-se que as plantas podem ser fontes mais produtivas em relação às algas.

4.2 Dosagens de proteína, açúcar total e sulfato

As dosagens de açúcar, proteína e sulfato foram realizadas a fim de caracterizar as galactomananas quimicamente. As galactomananas de leucena e de guar sulfatadas sofreram uma segunda sulfatação. A Tabela 3 traz os resultados das análises de forma sintética.

TABELA 3 - DOSAGENS DE PROTEÍNA E AÇÚCAR TOTAL DAS AMOSTRAS DE POLISSACARÍDEOS NATIVOS E SULFATADOS

Amostras	Proteína ^a (%)	Açúcar total ^b (%)	Conteúdo de Sulfato ^c (%)	Grau de Sulfatação
GN ^d	2,2	77,9	ND	0,0
GS ^e	1,8	58,3	8,6	0,25
LN ^f	3,0	76,0	ND	0,0
LSA ^g	4,1	42,8	15,2	0,60
LSB ^h	4,1 ⁱ	61,1 ⁱ	14,3 ⁱ	0,40 ⁱ

^aHARTREE, 1972; ^bDUBOIS et al., 1956; ^cDODGSON; PRICE, 1962; ^dGN: galactomanana nativa de guar; ^eGS: galactomanana sulfatada de guar; ^fLN: galactomanana nativa de *L. leucocephala*; ^gLSA: galactomanana sulfatada A de *L. leucocephala* (sintetizada no presente trabalho) e ^hLSB: galactomanana sulfatada B de *L. leucocephala* (gentilmente cedida pela Prof^a. Maria Rita Sierakowski); ⁱresultados apresentados em ONO et al., 2003; ^lcalculado de acordo com a equação $DS = n^{\circ} \text{ de mols de enxofre} / n^{\circ} \text{ de mols de unidades monossacarídicas}$; ND: não determinado
Fonte: O autor (2008)

Os resultados de dosagem de proteínas apresentados na Tabela 3 indicam que mesmo após o processo de purificação dos polissacarídeos nativos e, mesmo após a reação de sulfatação, ainda há proteína residual da semente (1,8-4,1%, dependendo da amostra analisada) que não pôde ser eliminada.

A quantidade de açúcar obtida para GS (58,3%) está abaixo de 77,9%, dosagem de GN e para a amostra LSA está abaixo de 76%, dosagem de LN. Isto

pode significar que houve uma maior substituição por grupamentos sulfatos nessa amostra, o que diminuiria o seu teor de açúcar. Outra hipótese que poderia explicar esse percentual baixo seria uma possível degradação da amostra durante as reações do processo de sulfatação.

4.3 Análise de Infravermelho

Essa análise teve como objetivo comprovar que as amostras de leucena e goma guar foram sulfatadas. Para isso, os espectros de infravermelho foram obtidos tanto do material nativo quanto. Nas amostras que passaram pelo processo de sulfatação, deveria haver o aparecimento de uma banda de vibração de estiramento axial de S=O em torno de 1250 cm^{-1} (TURVEY, 1965; FALSHAW; FURNEAUX, 1998), a qual se apresentaria ausente nas amostras nativas (FIGURAS 06 e 08). Portanto, essa banda deveria ser observada nos espectros da leucena e goma guar sulfatados (LSA e GS, respectivamente). A banda de vibração de estiramento axial de S=O (em torno de 1250 cm^{-1}) ficou bem caracterizada na amostra LSA, podendo ser verificado na Figura 10. Isso confirma a sulfatação da galactomanana (15,2% de sulfato ou 5,07% de enxofre pela turbidimetria e grau de sulfatação de 0,60).

Contudo, essa mesma banda não foi observada no espectro obtido da amostra de guar sulfatado (GS). É possível que a análise de infravermelho da amostra GS (FIGURA 8), devido ao fato de apresentar uma porcentagem de sulfato de 8,6% ou 2,87% de enxofre (pela dosagem turbidimétrica com BaCl_2 e um grau de sulfatação de 0,25, não tenha tido sensibilidade para a detecção da banda de estiramento de S=O. Portanto, pôde-se inferir que o grau de sulfatação do guar foi relativamente baixo e por isso não foi evidenciado no infravermelho.

ONO (2004) observou bandas de vibração de estiramento axial de S=O em torno de 1250 cm^{-1} em amostras de leucena e bracinga sulfatadas, as quais não puderam ser notadas nas amostras nativas das mesmas galactomananas. Ainda, neste mesmo trabalho, a região de absorção em torno de 820 cm^{-1} (sulfato equatorial) e a 850 cm^{-1} (sulfato axial) de vibração C-O-S que poderiam trazer informações com relação à posição de substituição dos grupamentos sulfato não foram observadas, pelo fato de o grau de sulfatação não ter sido suficientemente grande a ponto de causar tal vibração.

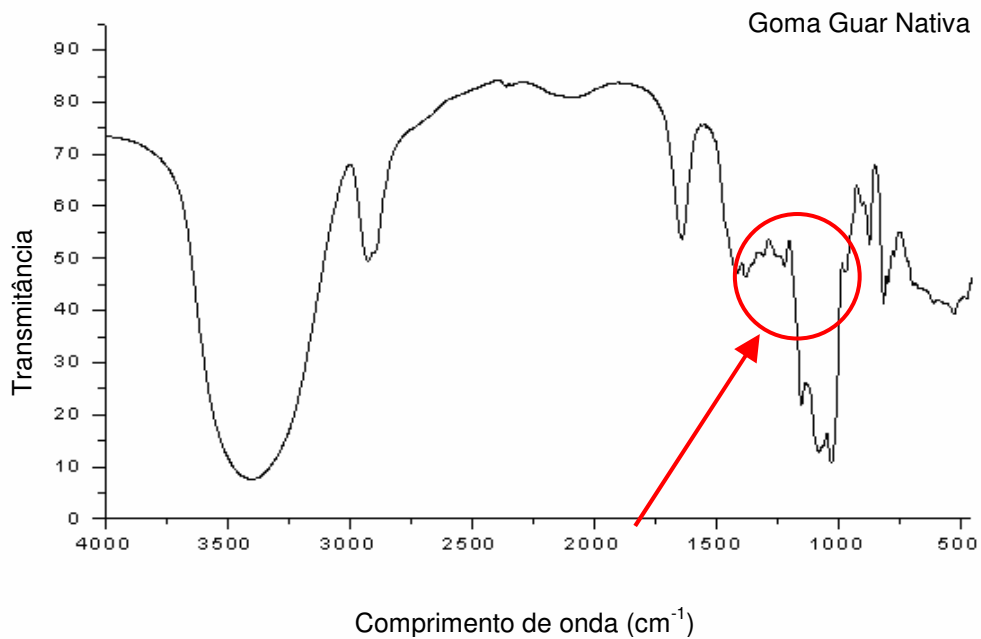


FIGURA 7 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA GN EM PASTILHA DE KBr.

*A seta aponta o local onde deverá aparecer após a sulfatação

Fonte: O autor (2008)

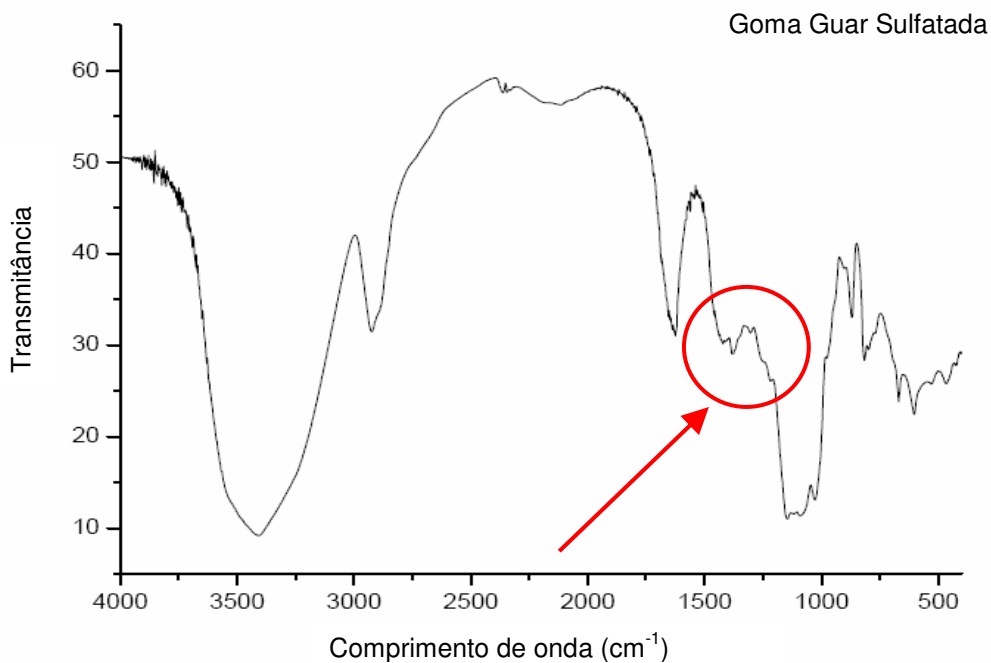


FIGURA 8 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA GS EM PASTILHA DE KBr.

*A seta aponta o local onde deveria aparecer sulfato após a obtenção do derivado

Fonte: O autor (2008)

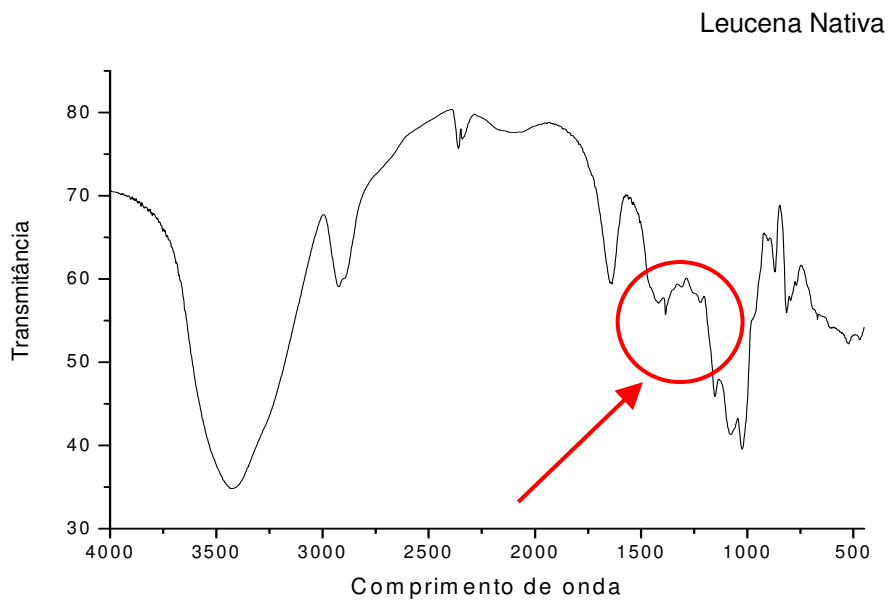


FIGURA 9 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA LN EM PASTILHA DE KBr.

*A seta aponta o local onde deverá aparecer após a sulfatação

Fonte: O autor (2008)

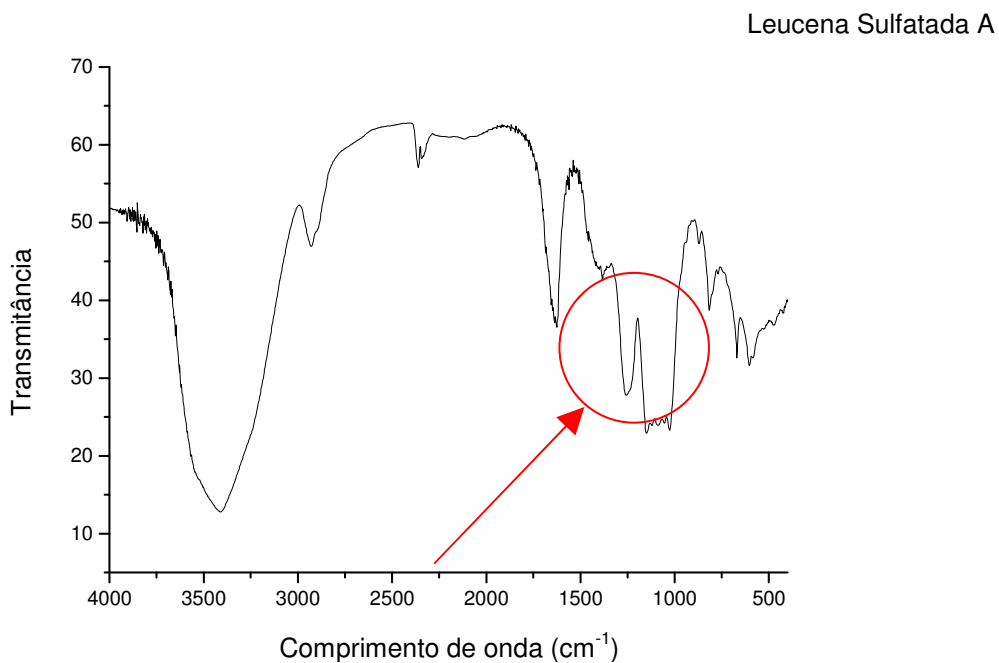


FIGURA 10 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA LSA EM PASTILHA DE KBr.

*A seta aponta o local onde se verifica a banda de sulfatação a 1250 cm⁻¹

Fonte: O autor (2008)

4.4 Análise por cromatografia líquido-gasosa

Os derivados alditóis-acetatos do material nativo e sulfatado foram analisados por cromatografia líquido-gasosa para a avaliação do grau de sulfatação dos monossacarídeos utilizados neste trabalho. Após a derivatização, os tubos contendo as amostras nativas e sulfatadas foram encaminhadas ao Departamento de Bioquímica - UFPR para a obtenção dos perfis de cromatografia líquido-gasosa. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 11 a 14 e Tabela 4.

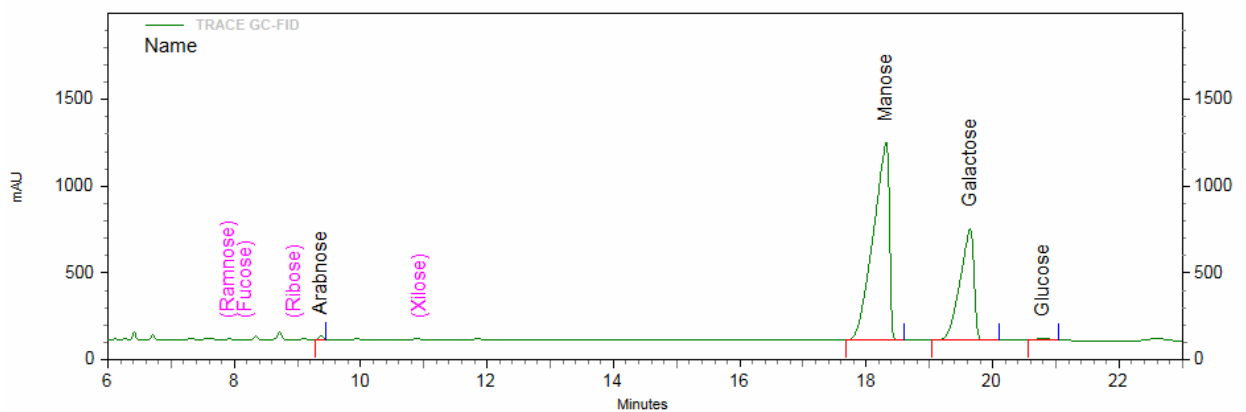


FIGURA 11 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE GLC PARA A AMOSTRA GN

Fonte: O autor (2008)

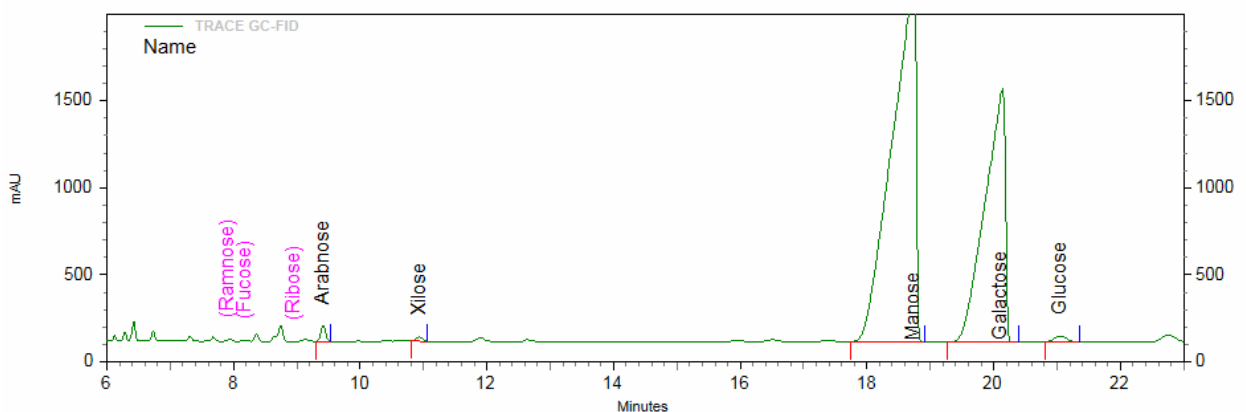


FIGURA 12 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE GLC PARA A AMOSTRA GS

Fonte: O autor (2008)

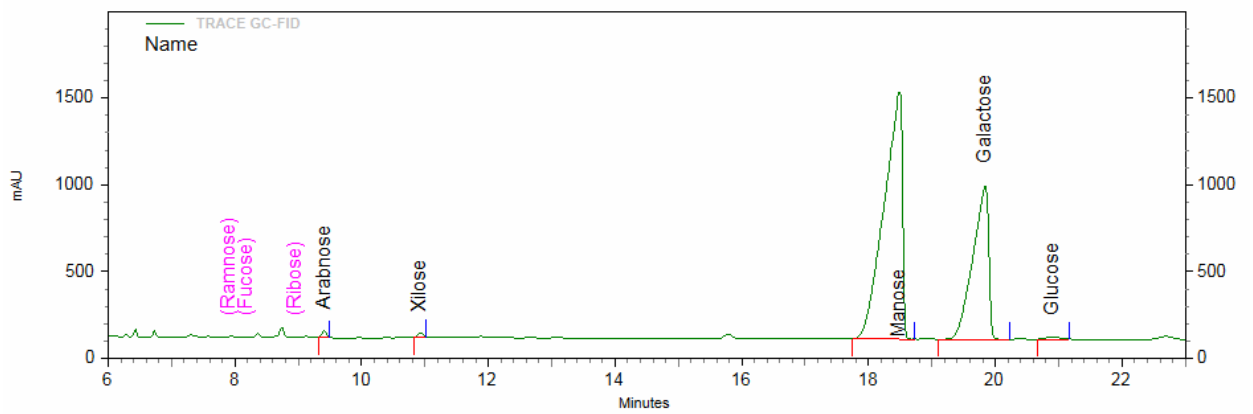


FIGURA 13 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE GLC PARA A AMOSTRA LN

Fonte: O autor (2008)

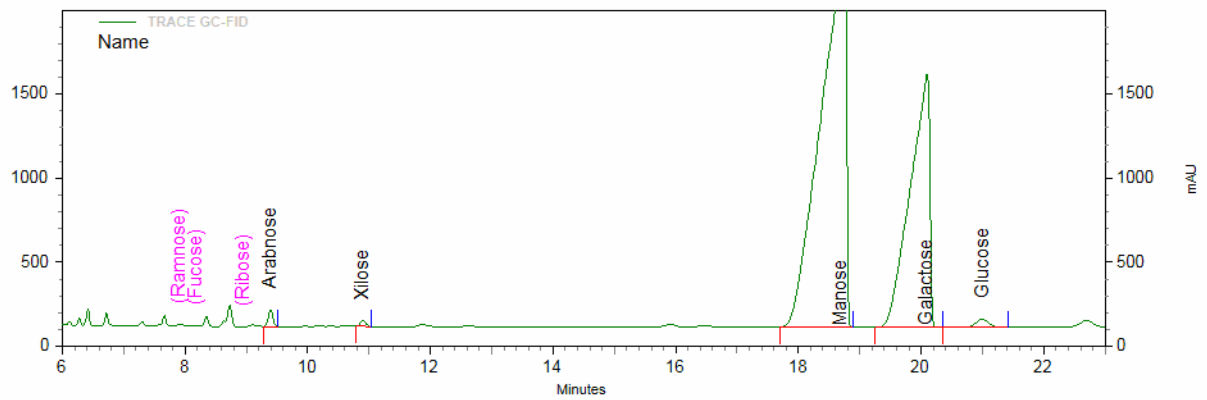


FIGURA 14 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE GLC PARA A AMOSTRA LSA

Fonte: O autor (2008)

TABELA 4 - PROPORÇÃO MANOSE/GALACTOSE DAS AMOSTRAS NATIVAS E SULFATADAS

Amostras	Proporção Man/Gal
GN ^a	1,88/1
GS ^b	1,64/1
LN ^c	1,90/1
LSA ^d	1,84/1
LSB ^e	1,40/1 ^f

Valores obtidos através de cromatografia líquido gasosa dos derivados alditóis-acetatos; ^aGN: galactomanana nativa de guar; ^bGS: galactomanana sulfatada de guar; ^cLN: galactomanana nativa de *L. leucocephala*; ^dLSA: galactomanana sulfatada A de *L. leucocephala* (sintetizada no presente trabalho) e ^eLSB: galactomanana sulfatada B de *L. leucocephala* (gentilmente cedida pela Prof^a. Maria Rita Sierakowski); ^fresultados apresentados em ONO et al., 2003; ND: não determinado. Os valores são médias da análise realizada em duplicata.

Fonte: O autor (2008)

Para o cálculo da proporção manose:galactose das amostras não foram levadas em consideração as áreas referentes aos monossacarídeos ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose e glucose, devido ao fato de serem de pouca representatividade em relação aos dois principais monossacarídeos, além de serem considerados contaminantes nesta análise.

ONO (2004) observou proporção Man:Gal em galactomananas de *Mimosa scabrella* de 1,14:1 e 2,92:1 para amostras de *Cassia fastuosa*. BUCKERIDGE *et al.* (1987) obtiveram relação molar Man:Gal de aproximadamente 2,0:1 em amostras de *L.leucocephala*, mostrando que as variações entre as amostras ocorrem devido às diferenças existentes entre as espécies diferentes de plantas, locais de coleta, épocas do ano e metodologias usadas na purificação e extração adotadas.

Houve diferença entre os resultados obtidos da galactomanana nativa e sulfatada de guar provavelmente porque a amostra sofreu algum grau de degradação durante o processo de sulfatação, o que não ocorreu com as amostras LN e LSA. Também se pode notar uma diferença entre as proporções Man:Gal das diferentes amostras de leucena sulfatadas avaliadas neste estudo. Verifica-se um maior grau de substituição em LSB e isto poderia ser explicado, além das hipóteses levantadas anteriormente, pelo fato de as duas amostras terem sido sulfatadas em períodos distintos.

4.5 Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de guar e de *L. leucocephala* em células VERO:

Este experimento teve como objetivo analisar a citotoxicidade dos polissacarídeos testados neste trabalho quando colocados em contato com as células VERO e determinar a Concentração Citotóxica 50% (CC50), ou seja, a concentração de polissacarídeo necessária para provocar a morte de 50% das células presentes no cultivo celular. Este dado tem grande importância nas pesquisas de novas drogas e medicamentos, pois é utilizada para se determinar um índice terapêutico, obtido pela relação concentração inibitória da replicação viral 50%/ concentração citotóxica 50% (PAGE *et al.* 2004).

A metodologia de avaliação da citotoxicidade pelo MTT se baseia na conversão do sal de tetrazólio (brometo de 3-(4'5'-dimetil-tiazol-2il)-2,4-difeniltetrazólio (MTT), de coloração amarela à formazan, azul escuro, pelas células vivas, isto significa dizer que a diminuição do número de células vivas pode ser observada por meio de diminuição no valor da absorbância do formazan produzido.

A fim de se reproduzir as condições de utilização dos polissacarídeos nos experimentos de atividade antiviral, onde essas moléculas seriam colocadas em contato com o vírus HSV-1 durante a sua adsorção (etapa onde o inoculo viral é adicionado ao cultivo celular por um período de 1,5h antes da adição do meio de cultura de manutenção) e após a sua adsorção (etapa correspondente a 1,5h após a adsorção viral).

Esta metodologia foi adotada para testar a possível toxicidade dos polissacarídeos não somente em diferentes concentrações, mas também mimetizando dois momentos importantes da infecção viral: os períodos de adsorção viral e pós-adsorção. Nas figuras a seguir podem ser observados os valores de absorbância de cada poço da microplaca obtidos a partir da leitura do aparelho de ELISA. A coluna CN representa o controle negativo, no qual a adição de células foi nula e na coluna CP o controle positivo, no qual não foi adicionada nenhuma concentração de polissacarídeo. É a partir do controle positivo que se pode aplicar os testes estatísticos, pois o objetivo do teste foi comparar a morte celular ocorrida no controle positivo com a das demais colunas, nas quais foram adicionadas as diferentes concentrações de leucena e de guar.

Tinha-se grande dúvida com relação à sulfatação da amostra de GS, visto que nenhuma banda de vibração de estiramento axial pôde ser observada durante as análises de infravermelho. Entretanto, um percentual de grupamento sulfato foi verificado na análise pelo método turbidimétrico por precipitação com cloreto de bário e, por isso, as análises de toxicidade das galactomananas de guar (GN e GS) foram realizadas.

Com relação aos experimentos denominados “durante a adsorção” foi possível avaliar a citotoxicidade dos polissacarídeos galactomanana nativa de goma guar (FIGURA 15a) e galactomanana sulfatada de goma guar (FIGURA 16a), e as amostras, em todas as concentrações testadas (0,245-125 µg/poço), não apresentaram redução estatisticamente significativa no número de células viáveis em relação ao controle, indicando ausência de citotoxicidade. Pelo fato da amostra de goma guar ser amplamente utilizada pela indústria farmacêutica e, principalmente, a de alimentos era de se esperar que essa galactomanana não apresentasse toxicidade celular (LUCYSZYN, 1994). As Figuras 15 (a e b) trazem um comparativo entre as médias de absorbância obtidas da amostra GN nas duas fases do experimento.

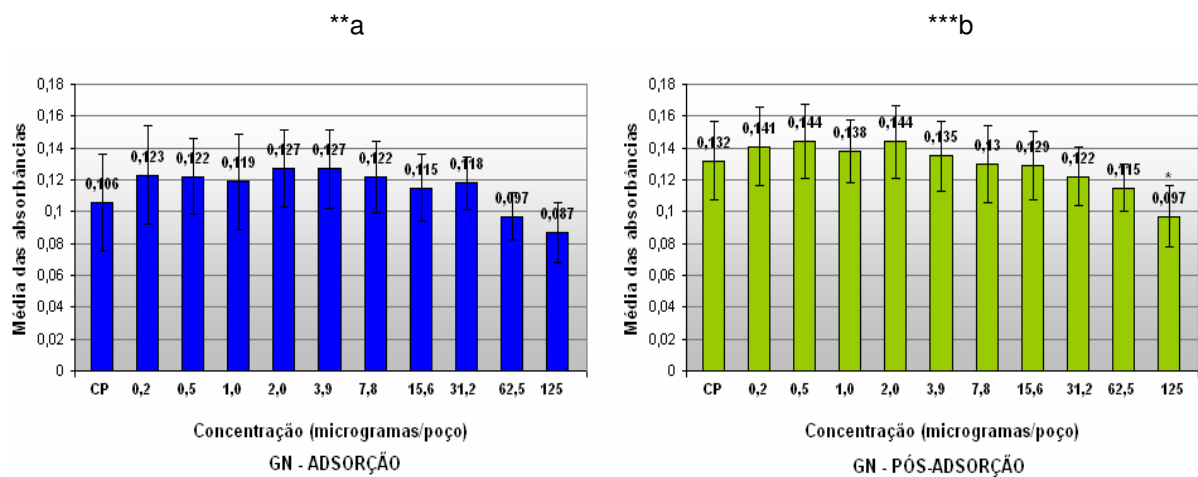


FIGURA 15 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIAS OBTIDAS DA AMOSTRA GN

*indica diferença estatística

**a) Fase durante a adsorção

***b) Fase pós-adsorção

Fonte: O autor (2008)

Com relação aos experimentos denominados “após a adsorção”, a avaliação da citotoxicidade da galactomanana nativa de goma guar (FIGURA 15b) indicou redução de 26,5% no número de células viáveis ($CC_{26,5}$) na concentração de 125 μ g/poço. Sendo assim, pode-se evidenciar que o grau de toxicidade é dependente do tempo no qual a célula é deixada em contato com o polissacarídeo, tempo este que foi de 72 horas para o experimento citado.

Na Figura 16b (teste pós-adsorção), a amostra de galactomanana sulfatada de goma guar (GS) apresentou citotoxicidade a partir de 125 μ g/poço (concentração citotóxica 35,7% - $CC_{35,7}$).

Analisando os resultados obtidos durante a realização das fases do experimento de MTT se notou que não houve diferenciação entre os resultados de toxicidade celular da amostra nativa e sulfatada (FIGURAS 16 a e b), o que indica possivelmente que se a sulfatação ocorreu, ela se deu em baixa escala ou simplesmente não aconteceu. Apesar dos resultados do MTT indicarem tal fato, este somente poderá ser confirmado após a avaliação do potencial antiviral de GN e GS contra o HSV-1 *in vitro*.

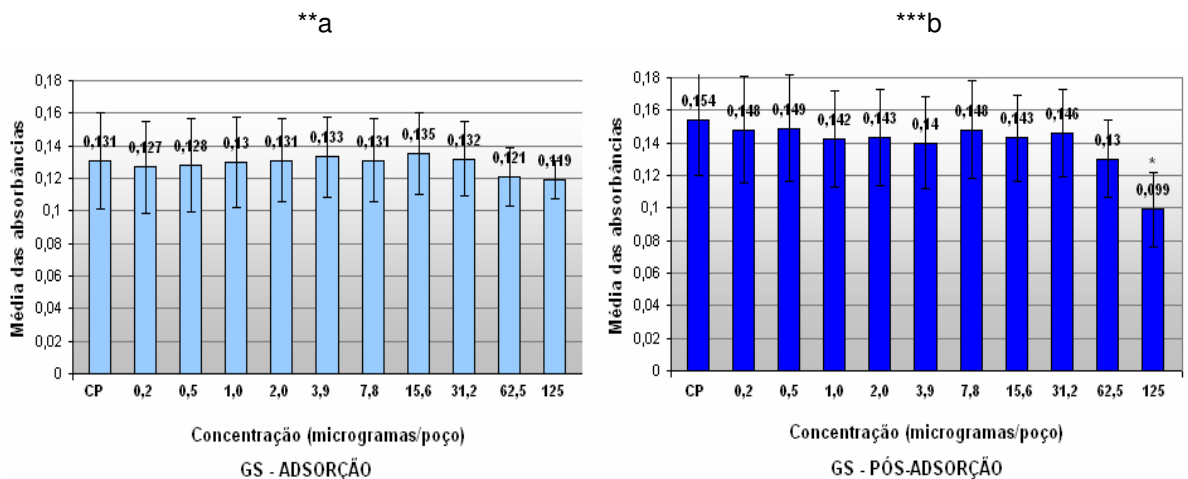


FIGURA 16 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIAS OBTIDAS DA AMOSTRA GS

*indica diferença estatística

**a) Fase durante a adsorção

***b) Fase pós-adsorção

Fonte: O autor (2008)

No experimento durante adsorção, a galactomanana nativa extraída de sementes de *Leucaena leucocephala* (FIGURA 17a) parece apresentar propriedade estimuladora do crescimento celular (24,1; 30,1; 34,4 e 23,2% mais células que o controle positivo) nas concentrações de 0,245, 0,488, 0,976 e 3,906 $\mu\text{g}/\text{poço}$, respectivamente. No entanto, essa avaliação precisará ser refeita para a sua confirmação, pois não há uma relação direta entre o aumento da concentração do polissacarídeo e a atividade estimuladora do crescimento. Na concentração 1,953 μg de polissacarídeo por poço, não houve diferença estatisticamente significativa em comparação ao controle.

Uma outra hipótese para esses achados estatísticos seria, possivelmente, o fato de ter ocorrido algum problema com o controle positivo em relação à quantidade de células ali adicionadas, pois quando se compara as médias dos valores das colunas das concentrações mais baixas (TABELA 9), nota-se que os valores médios de absorvância (a qual representa o número de células viáveis) são próximos um do outro. Ainda, essa diferença estatística do controle positivo com as menores concentrações de polissacarídeos não é evidenciada no experimento pós-adsorção, mostrando que estudos futuros deverão ser realizados para a comprovação da atividade estimulatória dos polissacarídeos (FIGURA 17b).

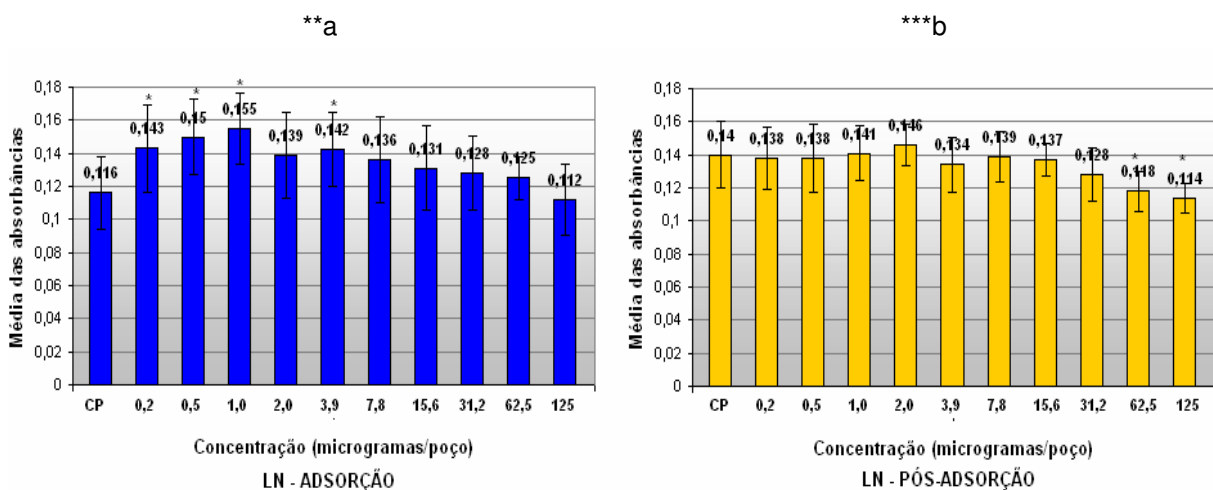


FIGURA 17 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIAS OBTIDAS DA AMOSTRA LN

*indica diferença estatística

**a) Fase durante a adsorção

***b) Fase pós-adsorção

Fonte: O autor (2008)

A amostra LN após adsorção apresentou 18,8% de toxicidade a 62,5 µg/poço (CC_{18,5}) (FIGURA 17b). A toxicidade para essas amostras não foi evidenciada no experimento durante a adsorção (FIGURA 17a), indicando também toxicidade diretamente proporcional ao tempo maior de exposição.

Durante a fase de adsorção (FIGURA 18a), a amostra LSA sintetizada neste trabalho apresentou citotoxicidade acima de 31,25 µg/poço (concentração citotóxica 16,5% - CC_{16,5}) e citotoxicidade de 38,8% a 62,5 µg/poço. A avaliação de concentrações superiores a 125 µg/poço é dificultada pelo aumento de viscosidade das amostras, impedindo a esterilização por meio de filtração por membranas de 0,22 µm de diâmetro.

No experimento durante a adsorção (FIGURA 19a), a amostra LSB apresentou citotoxicidade acima de 15,625 µg/poço (concentração citotóxica 19,2% - CC_{19,2}) e citotoxicidade de 34,8% a 125 µg/poço. Este experimento também precisará ser feito com um n>8, pois na concentração de 0,245 µg/poço, houve um aumento de 14,6% no número de células viáveis com relação ao controle positivo. Esse resultado também poderia sugerir que a atividade estimulante do crescimento celular seria mais alta em menores concentrações do polissacarídeo, podendo existir uma concentração ideal para esse estímulo, a partir da qual concentrações mais altas passassem a exercer efeito citotóxico (que superasse o efeito estimulante). Em experimento de administração oral em camundongos, a amostra LSB não se apresentou letalmente tóxica abaixo da dose de 5mg/kg. Porém, observou-se diminuição no ganho de peso dos animais em concentrações mais altas (ONO et al., 2003).

JORGE *et al.* (2007) trabalhando com um número menor de amostras (teste com 4 amostras ao invés de 8) não observaram citotoxicidade para LSB em concentrações menores que 31,25 µg/poço, na fase que mimetiza a adsorção viral. Concentrações superiores não foram testadas por esse autor e seus colaboradores, sugerindo que talvez seja necessário estipular um número mínimo de amostras para se ter um resultado confiável.

As amostras LSA e LSB (FIGURAS 18b e 19b) foram as que apresentaram maior toxicidade sobre células VERO no experimento após a adsorção. A Tabela 12 (LSA) indicou redução no número de células viáveis de 19,9% (CC_{19,9}) a partir de 0,488 µg/poço. A Tabela 14 (LSB) indicou redução no número de células viáveis de

20,5% (CC_{20,5}) a partir de 1,953 µg/poço. Observou-se, portanto maior toxicidade dos polissacarídeos sulfatados durante o experimento após a adsorção com relação às amostras não-sulfatadas (FIGURA 18a e 19a).

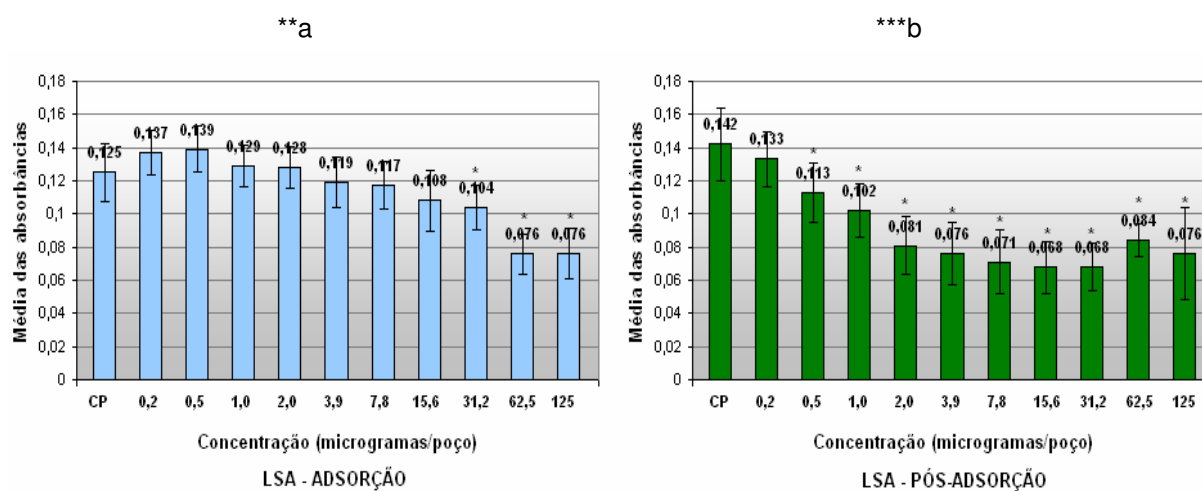


FIGURA 18 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIAS OBTIDAS DA AMOSTRA LSA

*indica diferença estatística

**a) Fase durante a adsorção

***b) Fase pós-adsorção

Fonte: O autor (2008)

Comparando as duas amostras de leucena sulfatadas, observa-se nos experimentos de pós-adsorção que a amostra LSA apresentou citotoxicidade maior que LSB em concentrações superiores a 1,953 µg/poço (FIGURA 19b). Nos resultados de LSA, na fração do experimento em que o polissacarídeo permaneceu em maior contato com o tapete celular (pós-adsorção), a morte celular pôde ser evidenciada desde a concentração 0,488 µg/poço (FIGURA 18b). Isso provavelmente se deveu ao maior tempo de permanência do polissacarídeo com a monocamada celular (aproximadamente 72h, sendo que na fração experimental anterior esse tempo foi de 1,5h). Com isso, pôde-se notar que há uma diferença significativa na forma de administração do polissacarídeo.

CHATTOPADHYAY *et al.* (2007) em seus testes de citotoxicidade de frações polissacarídicas isoladas de *Grateloupia indica* após 48 horas de incubação com o componente sulfatado, utilizando a metodologia do MTT com leitura a 595nm, obtiveram valores de concentração citotóxica 50% de 850 µg/mL.

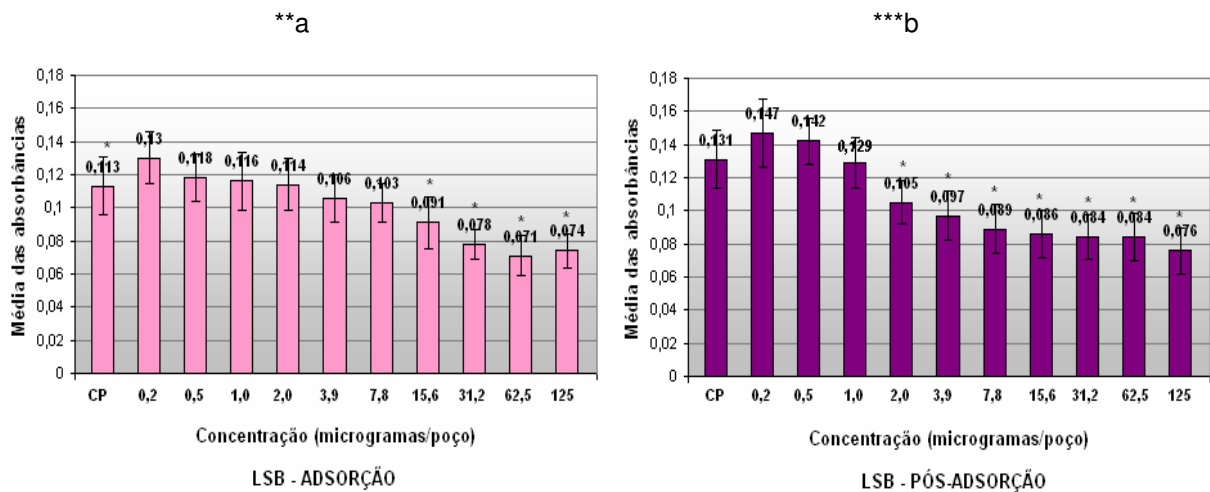


FIGURA 19 - COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ABSORBÂNCIAS OBTIDAS DA AMOSTRA LSB

*indica diferença estatística

**a) Fase durante a adsorção

***b) Fase pós-adsorção

Fonte: O autor (2008)

DAMONTE *et al.* (1996) constataram em seus estudos com xilogalactanas isoladas da alga vermelha *Nothogenia fastigiata* e atividade antiherpética (HSV-1) viabilidade celular testando-se o polissacarídeo a concentrações até 200 µg/mL.

GONZÁLES, ALARCON, CARRASCO (1987) em seus estudos com carragenanas em células He-La não verificaram nenhum efeito citotóxico sobre o cultivo celular até concentrações de 200 µg/mL.

Na figura a seguir, pode-se visualizar um poço de uma placa de 96 poços utilizada para a realização do experimento de MTT (FIGURA 20). Nele, é possível observar células incorporando o MTT (brometo de 3-(4'5'-dimetil-tiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazólio) e o metabolizando a cristais de formazan.

A determinação da CC50 (concentração citotóxica capaz de reduzir em 50% o número de células viáveis) não pôde ser determinada visto que seriam necessários testes em concentrações maiores.

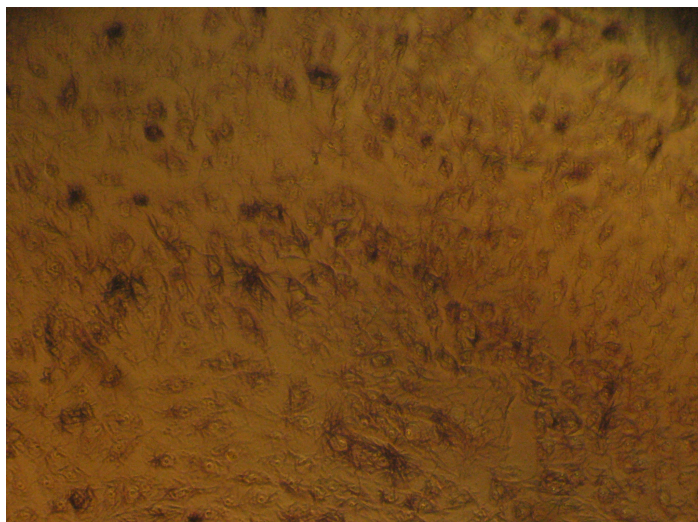


FIGURA 20 - MONOCAMADA DE CÉLULAS VERO DO CONTROLE POSITIVO (AUSÊNCIA DE POLISSACARÍDEOS) APRESENTANDO CRISTAIS DE FORMAZAN 3h APÓS A ADIÇÃO DE MTT (AUMENTO DE 100x)

Fonte: O autor (2008)

4.6 Teste de atividade antiviral *in vitro* das galactomananas nativas e sulfatadas de guar e de leucena contra o HSV-1:

Este experimento foi realizado com o objetivo de determinar se os polissacarídeos sulfatados apresentam potencial antiviral contra o vírus HSV-1, assim como para determinar a concentração inibitória 50% (CI50). Para isso, placas de cultivo celular de 24 poços foram utilizadas no teste. Para a galactomanana leucena foram feitas triplicatas e o experimento foi dividido em duas fases: adsorção e pós-adsorção, da mesma forma preconizada no experimento de toxicidade celular (MTT). Já para o guar, um experimento único foi realizado. Foram testadas diferentes concentrações para cada um dos polissacarídeos, levando-se em consideração os valores de citotoxicidade obtidos no experimento anterior. Isto com o intuito de que não se confundisse morte celular por toxicidade da galactomanana com o efeito citopático viral. Apesar de não ter sido estabelecida uma CC50, com os resultados do experimento anterior, puderam-se inferir as concentrações que apresentaram maior prejuízo às células.

Placas de 24 poços utilizadas para a determinação da atividade antiviral dos polissacarídeos podem ser visualizadas a seguir (FIGURA 21). Cada coluna vertical

de cada placa corresponde a uma diluição de saturação polissacarídica nas quais foram inoculados volumes constantes da diluição polissacarídica e da diluição viral (aproximadamente 100 unidades formadoras de placas – UFP/poço). O meio de cultura de manutenção é acrescido de metilcelulose, o que aumentou sua viscosidade e dificultou a migração de partículas virais produzidas após a infecção para regiões distantes do seu ponto de origem. Ou seja, o número de UFP observados seria maior que o de UFP inoculados ao poço.

Para a melhor observação da unidade formadora de placa, que corresponde a uma região da monocamada celular que apresenta efeito citopático induzido pelo vírus, os poços são corados com cristal violeta após 72h de infecção (para o HSV-1, esse efeito é caracterizado por arredondamento celular e formação de sincício – fusão de células).

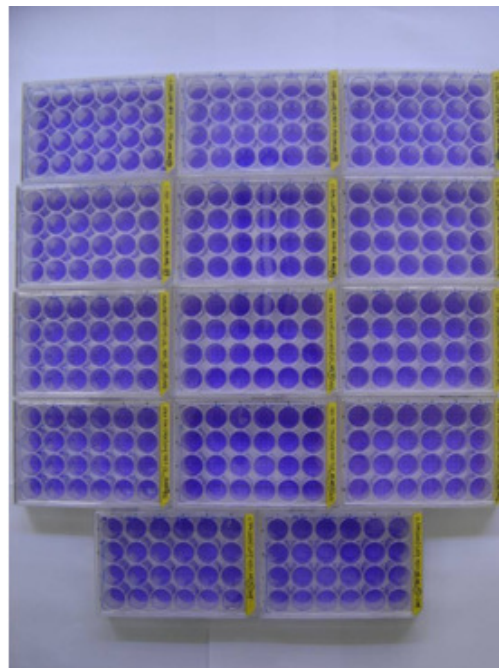


FIGURA 21 - PLACAS DE 24 POÇOS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GALACTOMANANAS NATIVA E SULFATADA DE GUAR (GN, GS) E LEUCENA (LN, LSA, LSB)

Fonte: O autor (2008)

Na Figura 22, pode-se observar a monocamada de células VERO com seu aspecto normal, sem efeito citopático (controle negativo), onde as células se apresentam achatadas, alongadas e aderidas à superfície do poço. Na Figura 23

observamos 3 focos de efeito citopático induzido pelo HSV-1 em um aumento de 100x e na Figura 24, a delimitação de 1 UFP, em um aumento de 250x.

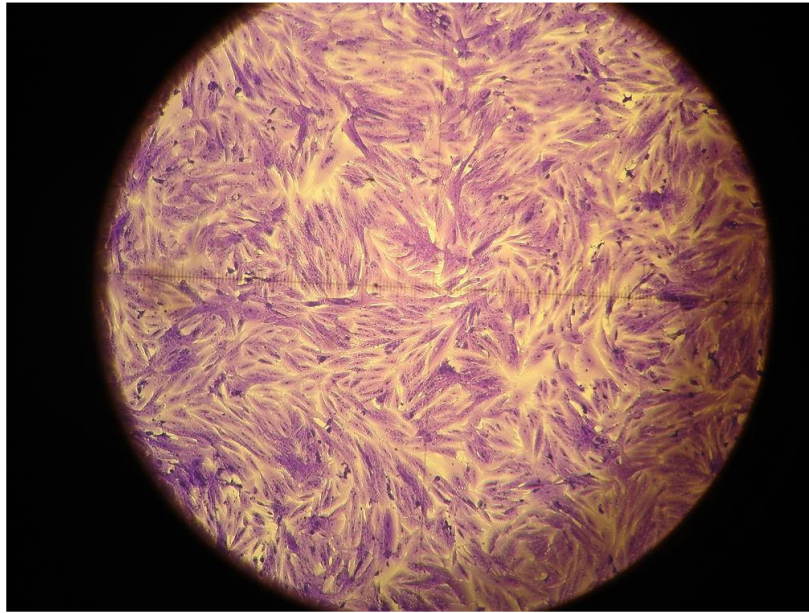


FIGURA 22 - CONTROLE NEGATIVO DO EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GN E GS (DURANTE ADSORÇÃO); CÉLULAS VERO CORADAS COM CRISTAL VIOLETA (AUMENTO DE 100x)

Fonte: O autor (2008)

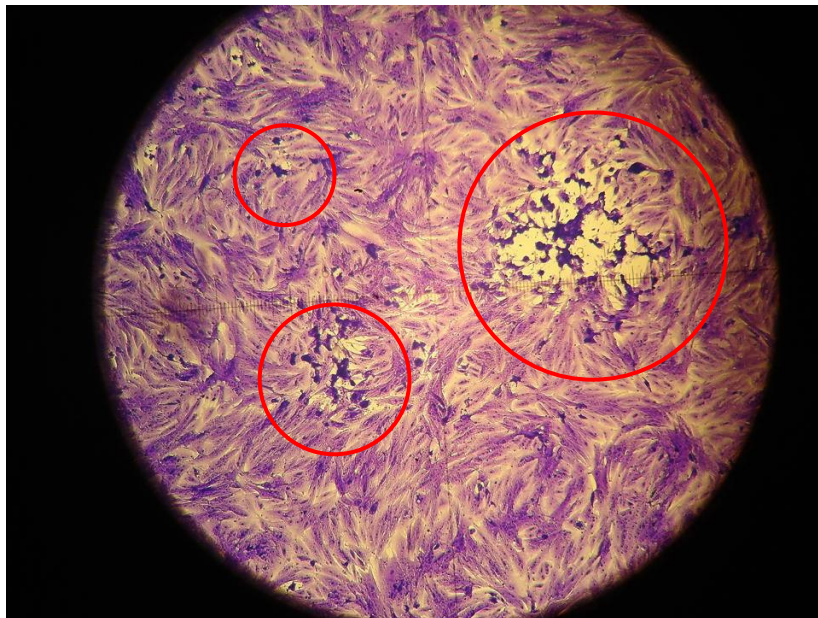


FIGURA 23 - CONTROLE POSITIVO DO EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GN E GS – EXPERIMENTO DURANTE ADSORÇÃO (HSV-1~100 UFP/POÇO); CÉLULAS VERO CORADAS COM CRISTAL VIOLETA, (AUMENTO DE 100x)

*Circunferências denotam três focos de efeito citopático ou UFP

Fonte: O autor (2008)



FIGURA 24 - CONTROLE POSITIVO DO EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE GN E GS – EXPERIMENTO DURANTE ADSORÇÃO (HSV-1~100 UFP/POÇO); CÉLULAS VERO CORADAS COM CRISTAL VIOLETA (AUMENTO DE 250x)

*Circunferência denota 1 foco de efeito citopático ou UFP

Fonte: O autor (2008)

Assim como no experimento de avaliação da citotoxicidade sobre células VERO, foram realizados dois tipos de experimentos para avaliar sobre qual etapa do ciclo de replicação do vírus HSV-1 os polissacarídeos sulfatados ou não atuam:

- Experimento 1 (FIGURAS 25, 27 e 29) – durante a adsorção: a suspensão viral (aproximadamente 100 UFP/poço) e os polissacarídeos (em diferentes concentrações) foram adicionados à placa de 24 poços contendo células VERO durante um período de 1,5h. Após esse intervalo, foram retirados e uma quantidade suficiente de meio de manutenção com metilcelulose (isenta de polissacarídeos) foi adicionada.

- Experimento 2 (FIGURAS 26, 28 e 30) – após a adsorção: após um período de incubação da suspensão viral sobre as células VERO de 1,5h, na ausência de polissacarídeos, eles foram posteriormente adicionados em diferentes concentrações à placa de 24 poços juntamente com meio de manutenção contendo metilcelulose. Posteriormente, foram mantidos por 72h em contato com as amostras e a suspensão viral.

Trabalhos anteriores (DAMONTE, 1996; MAZUNDER *et al.*, 2002) indicam que a etapa de adsorção viral seria bloqueada por macromoléculas negativamente carregadas como polissacarídeos sulfatados. A interação inicial do HSV-1 com a célula hospedeira se dá pela ligação da glicoproteína viral gC a moléculas de

heparan sulfato celular (HEROLD *et al.*, 1995). A estrutura mais externa da partícula viral é o seu envelope que contém curtas e numerosas espículas que são glicoproteínas. O HSV-1 especifica pelo menos 8 tipos diferentes de glicoproteínas (KNIPE; HOWLEY, 2001). Segundo DAMONTE (1996), a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados não depende diretamente da estrutura primária da cadeia de açúcar, mas da possibilidade de acomodação de grupos sulfato, carregados negativamente, sobre a superfície do vírus, bloqueando os receptores de cargas positivas necessários à ligação do vírus às células hospedeiras.

De acordo com o exposto acima, seria esperado que a atividade antiviral fosse observada para os polissacarídeos sulfatados (e não para os nativos, não-carregados) e a inibição da replicação viral acontecesse durante a etapa de adsorção (fixação) viral e não durante as etapas posteriores. Portanto, optou-se por testar uma faixa de concentrações em torno do limite onde as amostras apresentassem algum grau de toxicidade, relacionadas à quantidade de polissacarídeo adicionada por poço (considerando-se que os poços da placa de 24 poços utilizados na determinação da atividade antiviral têm área 4x maior que os presentes na placa de 96 poços utilizada na determinação da citotoxicidade).

Em virtude da amostra de galactomanana sulfatada de guar (GS) ter apresentado menor toxicidade dentre as demais testadas e o grau de sulfatação não ter sido confirmado pela espectroscopia de infravermelho, foram testadas concentrações maiores que as das amostras LSA e LSB, variando de 80-10 µg/mL (16-2 µg/poço), como pode ser observado nas Figuras 25 e 26. Porém, relacionado ao experimento durante a adsorção, como o controle negativo (CP) contendo a galactomanana nativa de guar (GN) também apresentou atividade de inibição da replicação do HSV-1 (99,7% a 80 µg/mL), não se pôde inferir que a atividade antiviral de GS (95,4% a 80 µg/mL e 55,6% a 10 µg/mL, respectivamente) aconteceu em virtude da presença de grupamentos sulfato. Será necessário testar diluições menores de GN para verificar se há diferença na atividade antiviral das moléculas nativa e sulfatada.

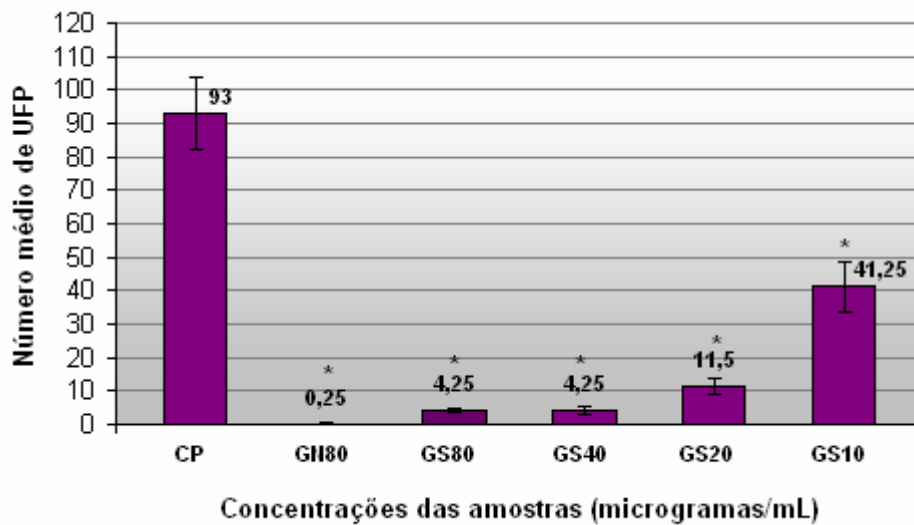


FIGURA 25 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV-1) DE GS, MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP EM RELAÇÃO AO CP (FASE DE ADSORÇÃO)

*Colunas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa

Fonte: O autor (2008)

No experimento após a adsorção (FIGURA 26), tanto GN como GS não apresentaram atividade antiviral uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo (contendo apenas vírus) e os poços teste (contendo vírus e polissacarídeo em diferentes concentrações). A ausência de atividade antiviral no experimento após a adsorção indica que, após a fixação do vírus à célula hospedeira, essas moléculas não influenciariam em etapas posteriores da replicação viral. Os resultados obtidos comprovam que o mecanismo de ação de GS está embasado especificamente na ação durante a fase de adsorção do vírus, fase em que ocorre a adesão do vírus à célula hospedeira.

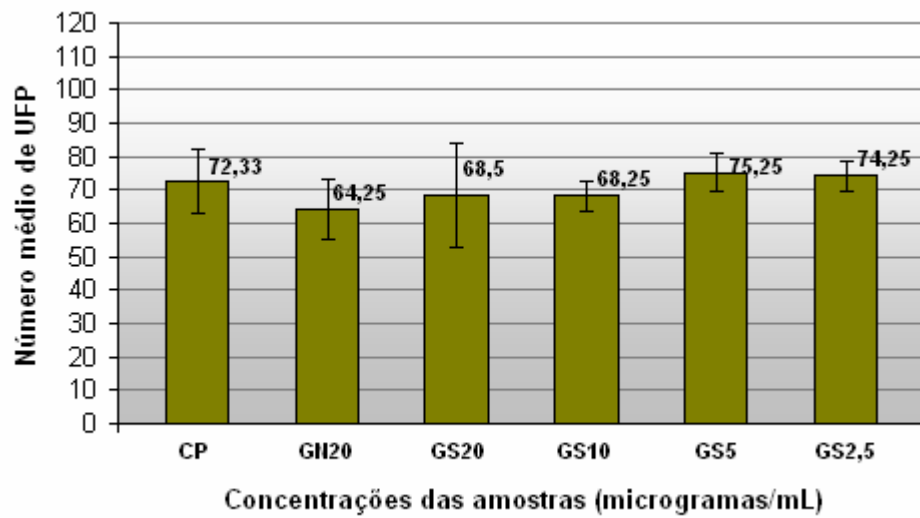


FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV-1) DE GS, MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE DE PÓS-ADSORÇÃO)

Fonte: O autor (2008)

Na Figura 27 que mostra os resultados de atividade antiviral da galactomanana LSA (durante a adsorção), é possível observar que a amostra é ativa em concentrações que variam de 20 $\mu\text{g/mL}$ (98,3% de inibição) a 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (93,7% de inibição), inibindo a adsorção viral. Observa-se também que há uma pequena inibição da replicação viral em etapas posteriores à fixação viral para LSA, que na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (equivalente à quantidade de 4 $\mu\text{g/poço}$) há 16% de inibição do HSV-1. A galactomanana nativa de leucena (LN) não apresentou atividade antiviral durante a adsorção ou após a adsorção na máxima concentração de LSA testada.

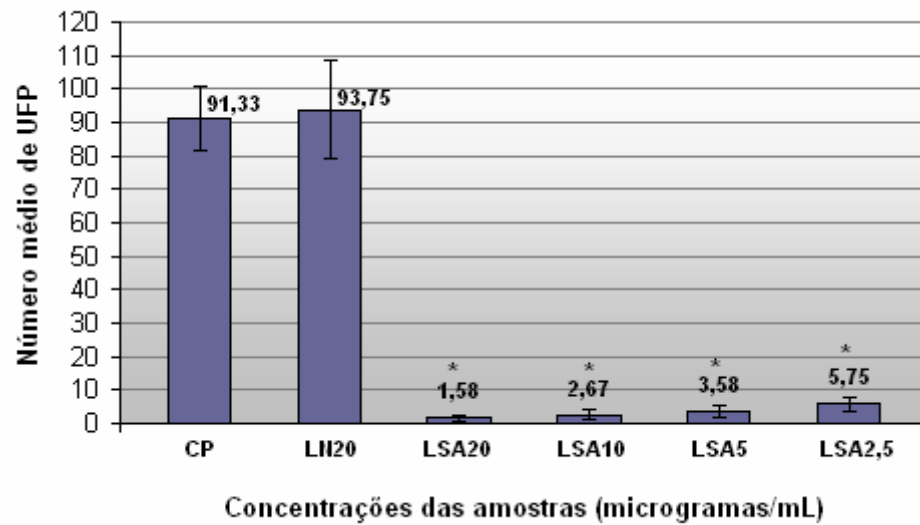


FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV-1) DE LSA MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE DE ADSORÇÃO)

*Colunas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa

Fonte: O autor (2008)

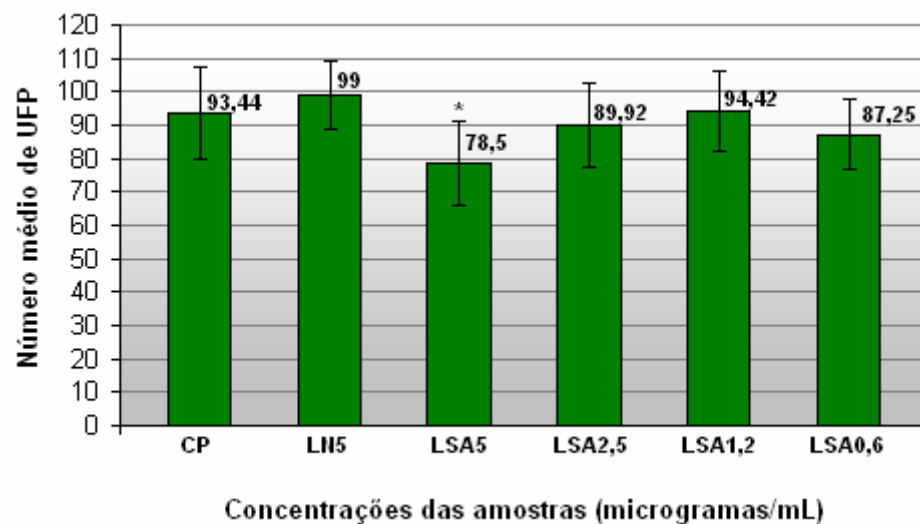


FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV -1) DE LSA MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE DE PÓS-ADSORÇÃO)

*Colunas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa

Fonte: O autor (2008)

Na Figura 29, que mostra os resultados de atividade antiviral da galactomanana sulfatada B de leucena (LSB), é possível observar que a amostra é ativa em concentrações que variam de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (97,0% de inibição) a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (86,3% de inibição), inibindo eficazmente a adsorção viral. Observa-se também, pela Figura 30, que há uma pequena inibição da replicação viral em etapas posteriores à fixação viral para LSB, que nas concentrações de 5-1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (equivalente à quantidade de 4-1,0 $\mu\text{g}/\text{poço}$) há 16-9,2% de inibição do HSV-1. GONZÁLES *et al.* (1987^{a,b}) afirmam que pode ocorrer atividade antiviral após o período de adsorção.

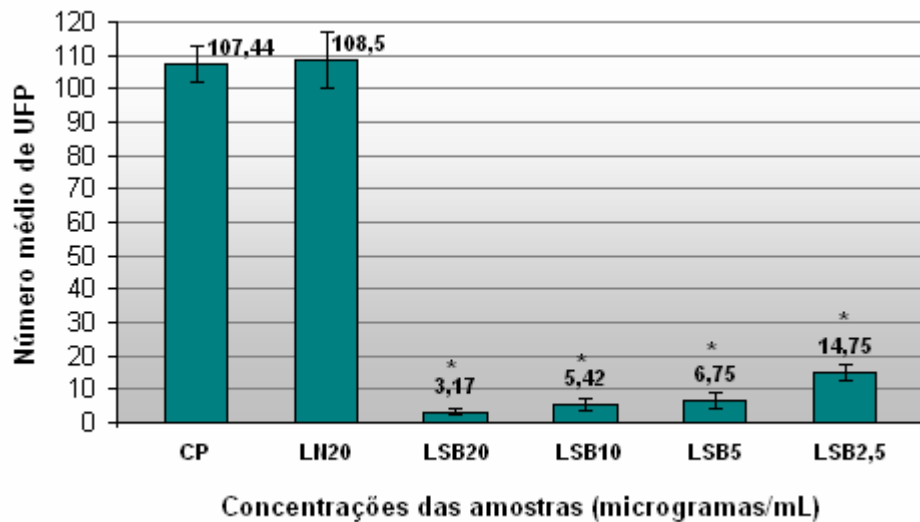


FIGURA 29 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV- 1) DE LSB, MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE DE ADSORÇÃO)

*Colunas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa

Fonte: O autor (2008)

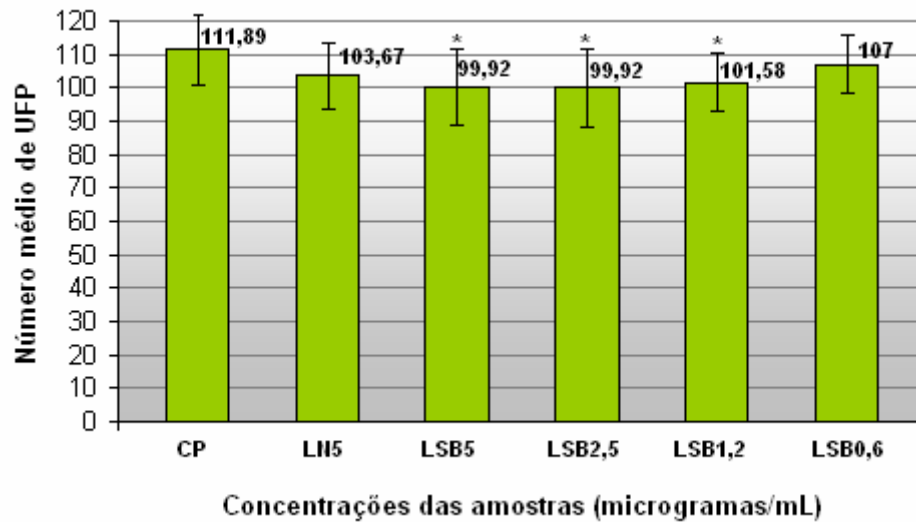


FIGURA 30 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL (CONTRA HSV- 1) DE LSB, MEDIDA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DO NÚMERO DE UFP COM RELAÇÃO AO CP (FASE DE PÓS-ADSORÇÃO)

*Colunas com asterisco apresentam diferença estatisticamente significativa

Fonte: O autor (2008)

TULIO (1998), em seus ensaios observaram atividade anti-herpética e anticoagulante por polissacarídeos sulfatados da alga *Bostryhia montagnei*. Com relação à atividade anticoagulante, as galactanas sulfatadas apresentaram baixa atividade tanto para o teste TT como para o APTT, quando comparada à atividade da heparina. No teste antiviral avaliado pelo método de redução de unidades formadoras de placas em células VERO, as galactanas sulfatadas apresentaram CI50 similares tanto para o HSV-1 quanto para HSV-2, com valores de 5,5 µg/mL e 6,2µg/mL, respectivamente. Houve inibição da replicação do vírus durante a fase de adsorção viral e também na fase pós-adsorção.

DAMONTE *et al.* (1996) em seus estudos com xilogalactanas sulfatadas extraídas de algas marinhas atingiram um efeito dose-dependente de inibição da replicação viral de HSV-1 em cultivo *in vitro* de células VERO, com 50% da dose efetiva na faixa dos 15 a 32 µg/mL, sem afetar a viabilidade celular. A presença dos grupamentos sulfato na molécula foi essencial para a verificação das propriedades antivirais deste polissacarídeo.

GONZÁLES; ALARCON; CARRASCO (1987) em seus estudos com carragenanas em células He-La verificaram que a concentrações de 5 µg/mL essas

galactomananas naturalmente sulfatadas previnem a monocamada celular da destruição causada pelo crescimento do HSV-1. A 10 µg/mL as carragenanas reduzem a formação de novos focos de infecção do vírus. Essas moléculas apresentaram-se neste estudo como potentes inibidores da síntese protéica viral, sendo que as células continuaram sintetizando suas próprias proteínas celulares. Entretanto esse efeito não ocorreu quando a carragenana foi adicionada uma hora após a adsorção viral. Segundo os autores, em estudos com marcadores imunofluorescentes, o polissacarídeo não apresentou efeito sobre a ligação ou a entrada do vírus na célula, e sim inibiu um passo subsequente à internalização na replicação viral antes do início da síntese protéica viral.

BUCK *et al.* (2006) em seus estudos com os vários tipos do vírus HPV e a ação de carragenanas sobre ele também notaram que o bloqueio da replicação viral desse polissacarídeo também ocorre em fases posteriores à ligação heparan-sulfato. Estes resultados corroboram com os encontrados neste estudo para a amostra LSB no período pós-adsorção, mostrando que a inibição também pode ocorrer em fases tardias da replicação viral.

Os resultados obtidos por esse estudo demonstram que em concentrações de polissacarídeos sulfatados menores do que as citadas pela literatura, ocorreu uma redução no número de UFP. As amostras LSA e LSB apresentaram maior atividade que GS, provavelmente devido ao maior grau de sulfatação apresentado pelas mesmas.

As amostras LSA e LSB se mostraram boas candidatas aos testes *in vivo*. Já a galactomanana de guar (especialmente GS) necessita de estudos futuros, como o desenvolvimento de uma metodologia diferenciada de sulfatação da molécula, ou a tentativa de uma terceira re-sulfatação.

5. CONCLUSÕES

- A amostra LN, ao final do processo de purificação, obteve um rendimento de 66,3%. Já a amostra da galactomanana sulfatada neste trabalho – LSA, após a purificação rendeu 35,0%. O rendimento da amostra de GN, após a purificação, foi de 57,0% e de GS foi de 36,6%. Ambas as amostras nativas apresentaram bom rendimento (superior a 50%), e, portanto o protocolo de purificação se mostra interessante para a aplicação em uma escala maior.
- A dosagem de açúcar das galactomananas nativas e sulfatadas pôde denotar claramente que houve substituição na molécula por grupamentos sulfato, de forma mais acentuada na amostra LN de 76% para 42,8% em LSA. Já nas amostras de goma guar essa diferença não se mostrou tão evidente (77,9% para 58,3%). Não se pode descartar a hipótese de que essa diferença também seja devido à degradação das amostras.
- As análises de infravermelho e dosagem de grupamento sulfato confirmaram a sulfatação da amostra LSA. A banda de vibração de estiramento axial de S=O em torno de 1250 cm^{-1} não pôde ser observada no espectro do GS, sugerindo que essa galactomanana não sofreu sulfatação. Para a confirmação do resultado de sulfatação da amostra de leucena, realizou-se a dosagem dos grupamentos sulfato que se apresentou em torno de 14,3%. Entretanto, o mesmo não foi tão significativo para o guar sulfatado, cujo valor foi de 8,0%.
- As galactomananas nativas e sulfatadas também foram analisadas por cromatografia líquido-gasosa com o intuito de mensurar a proporção de manose/galactose de cada polissacarídeo. As proporções para LN e LSA foram de 1,90/1 e 1,84/1, respectivamente. Os valores mensurados para o GN e GS foram: 1,88/1 e 1,64/1, respectivamente, indicando que a estrutura inicial do polissacarídeo nativo foi mantida.
- Com os experimentos realizados para determinar a citotoxicidade dos polissacarídeos pôde-se inferir que: a amostra de LN não apresentou toxicidade na etapa de adsorção que mimetiza o experimento de avaliação da atividade antiviral e a ação do polissacarídeo durante a etapa de adsorção viral. Traços de toxicidade celular para a amostra LN aparecem a partir da

concentração 62,5 µg/poço referente à toxicidade pós-adsorção, nas duas fases do teste (adsorção e pós-adsorção).

- Para a amostra de LSA, na fração experimental de adsorção do teste de citotoxicidade, a toxicidade celular aparece a partir de 31,25 µg/poço e na fase pós-adsorção a partir de 0,488 µg/poço, evidenciando que quanto maior for o tempo em que as partículas permanecem em contato com o cultivo, maior é o dano causado pela galactomanana. Um comparativo com a amostra LSB pôde evidenciar que a amostra LSA apresentou citotoxicidade maior que LSB, visto que a amostra LSB, em concentrações superiores a 1,953 µg/poço apresentou inviabilidade celular (pós-adsorção).
- Já nas amostras GN e GS (na fração adsorção) não há indícios de citotoxicidade, pois as médias de absorbância das diluições não diferiram estatisticamente do grupo controle positivo. Há, no entanto diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e a coluna que recebeu 125 µg de polissacarídeo por poço, na fração do experimento denominada pós-adsorção, indicando toxicidade quando os valores foram superiores a essa concentração.
- Os resultados dos experimentos de atividade antiviral comprovaram que a amostra LSA apresentou redução do efeito citopático e os resultados diferiram estatisticamente do grupo controle positivo. Também é possível verificar que houve diferença estatística quando se compara a amostra nativa à sulfatada. Esses experimentos foram divididos em duas fases (como os experimentos de citotoxicidade) e na fase adsorção há a redução do número de UFP (93,7% em relação ao grupo controle), o que não pode ser verificado na fase pós-adsorção. Quando se comparam as duas amostras de *L. leucocephala* sulfatada (LSA e LSB), nota-se que na fase do experimento em que a galactomanana é adicionada juntamente com o vírus, as diferentes concentrações de polissacarídeo sulfatado apresentaram inibição do efeito citopático viral e o aparecimento dos focos desse efeito (unidades formadoras de placa) decresceu. A inibição ocorreu também na menor concentração testada (2,5 µg/mL) apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle positivo. A maior inibição de efeito citopático aconteceu na concentração de 20 µg/mL, que foi a maior concentração

testada. A galactomanana sulfatada B de leucena (LSB) apresentou no experimento referente à atividade antiviral durante a adsorção viral redução de 97,0% (concentração de 20 µg/mL) a 86,3% (2,5 µg/mL) do número de UFP adicionadas ao controle positivo.

- A goma guar sulfatada (GS) apresentou redução do efeito citopático causado pelo vírus nas concentrações testadas (95,4% de redução a 80 µg/mL e 55,6% de redução a 10 µg/mL), porém, como a galactomanana nativa (GN) também apresentou atividade a 80 µg/mL (99,7% de redução), não foi possível inferir, neste caso que a atividade observada seja devido à presença de grupamentos sulfato, sendo necessário testar GN nas concentrações abaixo de 80 µg/mL para verificar se apresentará atividade antiviral semelhante a GS.
- Experimentos *in vivo* poderão ser realizados no futuro, com o intuito de melhor compreender os mecanismos de ação das galactomananas no organismo animal e humano quando estes são desafiados pelo vírus HSV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.M. Acid Hydrolysis of weak linkages. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 285-287, 1965.

ADAMS, R.L.P. **Laboratory techniques in Biochemistry and molecular biology – Cell culture for biochemists**, 2nd revised ed., Elsevier, p.1-10, 1990.

AMARAL, J. **Estudo reológico da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa***. Dissertação (mestrado em bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, 114 p., UFPR, Curitiba, 1998.

AMORNUT, C.; TOIDA, T.; IMANARI, T.; WOO, E.; PARK, H.; LINHARDT, R.; WU, S.J.; KIM, Y.S. A new sulfated β -galactan from clams with anti-HIV activity. **Carbohydr. Res.**, v.321, p. 121-127, 1999.

ARISAWA, M.; FUJITA, A.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; OCHIAI, H.; MORITA, N. Cytotoxic and antiherpetic activity of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.38, p.1624–1626, 1990.

ANDERSSON, L.O.; BARROWCLIFFE, T.W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E.A.; SODERSTROM, G. Molecular weight dependency of the heparin potentiated inhibition of thrombin and activated factor X. Effect of heparin neutralization in plasma. **Thromb. Res.**, v. 15, p. 531– 541, 1979.

BABA, M.; SNOECK, R.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E. Sulphated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 32, p. 1742–1745, 1988.

BOLTON, S. **Pharmaceutical Statistics – Practical and Clinical Applications**. New York: Marcel Dekker, 645 p., 1990.

BOURGOUGNON, N.; LAHAYE, M.; QUEMENER, B.; CHERMANN, J.-C.; RIMBERT, M.; CORMACI, M.; FURNARI, G.; KORNPROBST, J.-M. Annual variation in composition and *in vitro* anti-HIV-1 activity of the sulfated glucuronogalactan from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). **J. Appl. Phycol.** v. 8, p.155–161,1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica Herpes Simples (CID-10 B00)**. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/PDF/GVE0504.pdf>> acesso em 11 janeiro 2001.

BUCK, C.B.; THOMPSON, C.D.; ROBERTS, J.N.; MULLER, M.L.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Carrageenan Is a Potent Inhibitor of Papillomavirus Infection. **Plos. Pathogens**, v. 2, p. 671-680, 2006.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.; MALUF, A.M. Galactomanana de sementes de diferentes populações de *Leucaena leucocephala* **Revta. Brasil. Bot.**, v. 19, p.25-27, 1987.

CÁCERES, P.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; MATSUHIRO, B.; ZÚNIGA, E. A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. **Phytochem.**, v. 53, p. 81–86, 2000.

CARLUCCI, M.J.; PUJOL, C.A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B.; CEREZO, A.S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **Intern. J. of Biol. Macromol.**, v. 20, p. 97–105, 1997.

CHATTOPADHYAY, K.; MATEU, C.G.; MANDAL, P.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. **Phytochem.**, v. 68, p. 1428-1435, 2007.

CHE, C.T. Plants as a source of potential antiviral agents. **Econ. Med. Plant Res.**, v. 5, p. 197–237, 1991.

COEN, D.M. Antiviral drug resistance in Herpes simplex virus. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 394, p. 49–57, 1996.

COREY, L.; ADAMS, H.G.; BROWN, Z.A.; HOLMES, K.K. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course, and complications. **Ann. Intern. Med.**, v. 98 (6), p. 958–972 (Review), 1983.

DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CERREZO, A.S.; COTO, C.E. Herpes simplex virus-inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Chemother.**, v. 42, p. 57-64, 1996.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival - modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Meth.**, v. 89, p. 271-277, 1986.

DESHMANE, S.L.; FRASER, N.W. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. **J Virol**, v. 63, p. 943–947, 1989.

DODGSON, K.S.; PRICE, R.G.; Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrates and their sulphate esters. **Biochem. J.**, v. 84, p. 106-209, 1962.

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

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga

Bostrychia montagnei on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomed.**, v. 8, p. 53–58, 2001.

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

ERNST, M.E.; FRANEY, R.J. Acyclovir and ganciclovir induced neutrotoxicity. **Ann. Pharmacother.**, v. 32, p. 111–113, 1998.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, RH. Structural analysis of carrageenans from the tetrasporic stages of the red algae *Gigartina chapmanii* (Gigartinaceae, Rodophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 307, p. 325-331, 1998

FERREA, G.; CANESSA, A.; SAMPIETRO, F.; CRUCIANI, M.; ROMUSSI, G.; BASSETTI, D. In vitro activity of a *Combretum micranthum* extract against Herpes simplex virus type 1 and 2. **Antivir. Res.** v. 21, p. 317–325, 1993.

FRANZ, G.; PAUPER, D.; ALBAN, S.; IN: PAULSEN, B.S. (Ed.) **Bioact. Carbohydr. Pol.**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 47–58, 2000.

FRESHNEY, R.I **Culture of animal cells – A manual of basic techniques**, 2nd ed., Wiley-Liss, p. 7-13, 245-256, 1990.

GANTER, J.L.M.S.; **Estudos de carboidratos de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga): Análise estrutural dos oligossacarídeos e propriedades reológicas da galactomanana**. Curitiba, 1991, Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, 126p., UFPR.

GERAGHTY, R.J.; KRUMMENACHER, C.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J.; SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor related protein 1 and poliovirus receptor. **Science**, v. 280, p. 1618–1620, 1998.

GERBER, S.I.; BELVAL, B.J.; HEROLD, B.C. Differences in the role of glycoprotein C of HSV-1 and HSV-2 in viral binding may contribute to serotype differences in cell tropism. **J. Virol.**, v. 214, p. 29–39, 1995.

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

GILMAN, A.G. et al. In: **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**, 8^a ed., Ed. Guanabara Koogan S.A., p. 32-39, 784-797, 1991.

GONZÁLES, M.E.; CARRASCO, L. Animal viruses promote the entry of polysaccharides with antiviral activity into cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 146(3), p. 1303-1310, 1987^a.

GONZÁLES, M.E.; ALARCON, B; CARRASCO, L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.31 (9), p. 1388-1393, 1987^b.

HAMMER, S.M.; INOUE, R.T. Antiviral agents. In: RICHMAN, D.D.; WHITLEY, R.J.; HAYDEN JR., F.G. (EDS.) **Clin. Virol.**, Churchill Livingstone, New York, p. 186–201, 1997.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytic. Biochem.**, v. 48 (2), p. 422-427, 1972.

HARDIN, T.C. Sexually transmitted diseases. In: HERFINDAL, E.T.; GOURLEY, D.R. (Eds.) **Textbook of Therapeutics—Drug and Disease Management**. Williams and Wilkins, Baltimore, p.1389–1404, 1996.

HEROLD, B.C.; GERBER, S.I.; POLONSKY, T.; BELVAL, B.J.; SHAKLEE, P.N.; HOLME, K. Identification of Structural Features of Heparin Required for Inhibition of

Herpes Simplex Virus Type 1 Binding. **J. Virol.**, v. 206 (2), p. 1108-1116, 1995.

HOLLAND, E.J.; SCHWARTZ, G.S. Classification of herpes simplex virus keratitis. **Cornea**, v. 18 (2), p. 144–154, 1999.

HUTCHINSON, L.; JOHNSON, D.C. Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. **J. Virol.**, v. 69, p. 5401–5413, 1995.

ITZHAKI, R.F.; WOSNIAK, M.A. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: A dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders. **Prog. Lipid Res.**, v. 45, p. 73-90, 2006.

IVANOVA, V.; ROUSEVA, R.; KOLAROVA, M.; SERKEDJIEVA, J.; RACHEV, R.; MANOLOVA, N.; Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. **Prep. Biochem.**, v. 24, p. 83–97, 1994.

JAGODZINSKI, P.P.; WIADERKIEWICZ, R.; KURZAWSKI, G.; KLOCZEWIAK, M.; NAKASHIMA, H.; HYJEK, E.; YAMAMOTO, N.; URYU, T.; KANEKO, Y.; POSNER, M.P.; KOZBOR, D. Mechanism of the inhibitory effect of curdlan sulfate on HIV-1 infection in vitro. **J. Virol.**, v. 202, p. 735–745, 1994.

JOHNSON, R.E.; NAHMIAS, A.J. A seroepidemiologic survey of the prevalence of herpes simplex virus type 2 infection in the United States. **N. Engl. J. Med.**, v. 321 (1), p. 7–12, 1989.

JORGE, T.R.; GEMIN, E.; SIERAKOWSKI, M.R.; ONO, L. Determinação da citotoxicidade *in vitro* de galactomananas sinteticamente sulfatadas de sementes de *Leucena leucocephala* e de *Mimosa scabrella*. **Livro de resumos do 15º evento de Iniciação Científica – EVINCI – UFPR**, Curitiba, PR, 2007.

KALINYAK, J.E.; FLEAGLE, G.; DOCHERTY, J.J. Incidence and distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 from genital lesions in college women. **J. Med. Virol.**, v. 3, p. 175–181, 1977.

KNIPE, D.M.; HOWLEY P. M. **Fields Virology**, v.1, 4^a edição, Editora Courier Westford, USA, 2001.

KOLENDER, A.A.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. The system of sulfated α -(1 \rightarrow 3)-linked Dmannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties. **Carbohyd. Res.**, v. 304, p. 53–60, 1997.

KRUMMENACHER, C.; NICOLA, A.V.; WHITBECK, J.C.; LOU, H.; HOU, W.; LAMBRIS, J.D. Herpes simplex virus glycoprotein D can bind to poliovirus receptor-related protein 1 or herpesvirus entry mediator, two structurally unrelated mediators of virus entry. **J. Virol.**, v. 72, p. 7064–7074, 1998.

KWONG, A.D.; FRENKEL, N. Herpes simplex virus-infected cells contain a function (s) that destabilizes both host and viral mRNAs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 1926–1930, 1987.

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

LEE, J.B.; SRISOMPORN, P.; HAYASHI, K.; TANAKA, T.; SANKAWA, U.; HAYASHI, T. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. **Chem. Pharmaceut. Bullet.**, v. 49, p. 108–110, 2001.

LIN, L.C.; KUO, Y.C.; CHOU, C.J. Anti-herpes simplex virus type 1 principles and a new flavanone from the root of *Limonium sinense*. **Planta Med.**, v. 66, p. 333–336, 2000.

LUPI, O. Imunoprofilaxia anti-herpética utilizando vírus geneticamente modificado: vacina DISC. **An. Bras. Dermat.**, v. 78 (3), p. 345-353, Rio de Janeiro, maio/junho 2003.

LUCYSZYN, N. **Galactomananas: novas fontes do biopolímero e aplicações na indústria alimentícia**. Curitiba, 1994, Dissertação de Mestrado (Tecnologia de Alimentos), Setor de Ciências Tecnológicas.

MARCHETTI, M.; PIANI, S.; PIETROPAOLO, V.; SEGANTI, L.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Inhibition of Herpes simplex virus infection by negatively charged and neutral carbohydrate polymers. **J. Chemother.**, v. 7, p. 90–96, 1994.

MATUDA, T.G.; MARIA NETTO, F. Partial chemical characterization of jatobá-do-cerrado seeds (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online]. v. 25, n. 2, p. 353-357, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=acesso> em 11 de fevereiro de 2008.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (*Gracilariaceae, Rhodophyta*). **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 31, p. 87–95, 2002.

MERCE, A.L.R.; FERNANDES, E.; MANGRICH, A.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; SZPONGANICZ, B. Fe (III) Galactomannan Solid and Aqueous Complexes. Potentiometric, EPR Spectroscopy and Thermal Data. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 12, n. 6, 2001.

MESTECKINA, A.V.; EGOROV, A.V.; SHCHERBUKHIN, V.P. Synthesis of galactomanana sulfates. **Appl. Biochem. Micr.**, v. 42(3), p. 368-373, 2006.

MONTGOMERY, R.I.; WARNER, M.S.; LUM, B.J.; SPEAR, P.G. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. **Cell**, v. 87, p. 427–436, 1996.

MURRAY, M.T., PIZZORNO, J.E. **Textbook of Natural Medicine**. Churchill Living, China, 1999.

NAKASHIMA, H.; KIDO, Y.; KOBAYASHI, N.; MOTOKI, Y.; NEUSHUL, M.; YAMAMOTO, N. J. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 31, p. 1524-1528, 1987.

NELSON, N.A. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NEYTS, J.; REYMEN, D.; LETOURNEUR, D.; JOZEFONVICZ, J.; SCHOLS, D.; ESTE, J.; ANDREI, G.; MCKENNA, P.; WITVROUW, M.; IKEDA, S.; CLEMENT, J.; de CLERCQ, E. Differential antiviral activity of derivatized dextrans. **Biochem. Pharmacol.**, v. 50 (6), p. 743-751, 1995.

NEYTS, J.; SNOECK, R.; SCHOLS, D.; BALZARINI, J.; ESKO, J.D.; VANSCHERPDAEL, A.; DE CLERCQ, E Sulphated polymer inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparin sulfate. **J. Virol.**, v. 189, p. 48–58, 1992.

NICOLA, A.V.; MCEVOY, A.M.; STRAUS, S.E. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. **J. Virol.**, v. 77, p. 5324–5332, 2003.

OBARA, Y.; FURUTA, Y.; TAKASU, T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, H.; MATSUKAWA, S.; FUJIOKA, Y.; TAKAHASHI, H.; KURATA, T.; NAGASHIMA, K. Distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 genomes in Human spinal ganglia studied by PCR an *in situ* hibridization. **J. Med. Virol.**, v. 52(2), p. 136-42, 1997.

O'NEILL, A.N. Sulphated derivatives of laminarin. **Can. J. Chem.**, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

ONO, L. **Atividade Antiviral de Galactomananas Modificadas por Oxidação e/ou Sulfatação**. Curitiba, 2004, Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, 146p.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I.M.; COIMBRA, T.L.M.; GORIN, P.A.J.; SIERAKOWSKI, M.R. *In vitro* and *In vivo* antiviral properties of sulfated galactomananas against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Res.**, v. 60, p. 201-208, 2003.

PAGE, C.; CURTIS, M.; SUTTER, M.; WALKER, M.; HOFFMAN, B. **Farmacolologia Integrada**, 2^a edição, p. 91-109, São Paulo: Editora Manole, 2004.

PEPOSE, J.S.; KEADLE, T.L.; MORRISON, L.A. Ocular Herpes Simplex: Changing Epidemiology, Emerging Disease Patterns, and the Potencial of Vaccine Prevention and Therapy. **Am. J. Ophthalm.**, v. 141, n. 3, p. 547-557, 2006.

POPE, L.E.; MARCELETTI, J.F.; KATZ, L.R.; KATZ, D.H. Anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol correlates with intracellular metabolic conversion of the drug. **J. Lipid Res.**, v. 37, p. 2167–2178, 1996.

PETKOWICZ, C.L.O. **Polissacarídeos de sementes de *Leguminosae* - *Caesalpinioideae* e Análise Conformacional de Galactomanas**. Curitiba, 1998. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, 165p., UFPR.

PREEPRAME, S.; HAYASHI, K.; LEE, J.B.; SANKAWA, U.; HAYASHI, T. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, p. 484–485, 2001.

REEVES, W.C.; COREY, L.; ADAMS, H.G.; VONTVER, L.A.; HOLMES, K.K. Risk of recurrence after first episodes of genital herpes: relation to HSV type and antibody response. **N. Engl. J. Med.**, v. 305 (6), p. 315–319, 1981.

SACKS, S.L.; GRIFFITHS, P.D.; COREY, L.; COHEN, C.; CUNNINGHAM, A.; DUSHEIKO, G.M.; SELF, S.; SPRUANCE, S.; STANBERRY, L.R.; WALD, A.; WHITLEY, R.J. Introduction: Is a viral shedding a surrogate marker for transmission of genital herpes? **Antiviral Res.**, v. 63S1, p. S3-S10, 2004.

SAMUELSON, J.; LICHTENBERG, F.V. Doenças infecciosas In: CONTRAN, R.M.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. **Robbins - Patologia estrutural e funcional**, 5ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 269-335, 1994.

SEVERSON, J.L.; TYRING, S.K. Relation between herpes simplex viruses and human immunodeficiency virus infections. **Arch. Dermatol.**, v. 135 (11), p. 1393–1397, 1999.

SHANNAN, W.M. Antiviral agents and viral diseases of man. In: GALASSO, G.J., MERIGAN, T.C., BUCHANAN, R.A. (Eds.), **Antiviral Agents and Viral Diseases of Man**. New York: Raven Press, p. 55– 121, 1984.

SIMONES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytother. Res.**, v. 21, p. 317–325, 1999.

SOMOGYI, M.A. New reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária, p. 438-440, 3ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

SYDISKIS, R.J.; OWEN, D.G.; LOHR, J.L.; ROSLER, K.H.; BLOMSTER, R.N. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, p. 2463–2466, 1991.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 34, p. 63-71, 2004.

TALYSHINSKY, M.M.; SOUPRUN, Y.Y.; HULEIHEL, M.M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. **Canc. Cell Int.**, v.2, 2002.

TAL-SINGER, R.; LASNER, T.M.; PODRZUCKI, W.; SKOKOTAS, A.; LEARY, J.J.; BERGER, S.L. et al. Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. **J. Virol.**, v. 71, p. 5268–5276, 1997.

TURVEY, J.R. Sulfates of simple sugars. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 20, p. 183-218, 1965.

TULIO, S. **Polissacarídeos sulfatados isolados de *Bostrychia montagnei* (Rhodophyta, Ceramialis)**. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

ZHU, W.; CHIU, L.C.M.; OOI, V.E.C.; CHAN, P.K.S.; ANG JR, P.O. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against Herpes simplex virus type 1. **Phytomed.**, v. 1, p. 01-06, 2005.

WAGNER, E.K.; DEVI-RAO, G.; FELDMAN, L.T.; DOBSON, A.T.; ZHANG, Y.F.; FLANAGAN, W.M. et al. Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons. **J. Virol.**, v. 62, p. 1194–1202, 1988.

WEBER, B.; CINATL, J. Antiviral therapy of herpes simplex virus infection: recent developments. **J. Eur. Acad. Derm. Venerlog.**, v. 6, p. 112–126, 1996.

WHITLEY, R.J.; KIMBERLIN, D.W. Herpes simplex viruses. **Clin. Infect. Dis.**, v. 26 (3), p.541–553, 1998.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex viruses. In: RICHMAN, D.D.; WHITLEY, R.J.; HAYDEN, F.G. (EDS.). **Clin. Virol.**. Churchill Livingstone, New York, p. 380–382, 1997.

WITVROUW, M.; ESTE, J.A.; MATEU, M.Q.; REYMEN, D.; ANDREI, G.; SNOECK, R.; IKEDA, S.; PAUWELS, R.; BIANCHINI, N.V.; DESMYTER, J., DE CLERCQ, E. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardiella*

tenera against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiv. Chem. Chemother.**, v. 5, p. 297–303, 1994.

WITVROUW, M.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. **Antivir. Chem. Chemother.**, v. 5, p. 345–359, 1994.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation methods. **Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963.

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

YOUSOUFIAN, H.; HAMMER, S.M.; HIRSCH, M.S.; MULDER, C. Methylation of the viral genome in an in vitro model of herpes simplex virus latency. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 2207–2210, 1982.

YOOSOOK, C.; CHANTRATITA, W.; RIMDUSIT, P. Recovery frequencies of herpes simplex virus Types 1 and 2 from symptomatic and asymptomatic genital herpes cases and antiviral sensitivities of isolates. **J. Med. Assoc. Thailand**, v. 72 (10), p. 572–576, 1989.

YOON, S.J.; CHU, D.C.; JUNEJA, L.R. Chemical and Physical Properties, Safety and Application of Partially Hydrolysed Guar Gum as a Dietary Fiber. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 42, p. 1–7, 2008.

ANEXOS

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA NATIVA DE GUAR (GN) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,115	0,137	0,120	0,120	0,125	0,141	0,135	0,105	0,122	0,109	0,106
B		0,066	0,088	0,087	0,069	0,097	0,101	0,097	0,100	0,112	0,075	0,065
C		0,113	0,134	0,129	0,121	0,144	0,144	0,127	0,142	0,123	0,104	0,089
D		0,077	0,096	0,110	0,119	0,106	0,112	0,114	0,107	0,107	0,085	0,063
E		0,083	0,111	0,104	0,091	0,107	0,110	0,104	0,101	0,104	0,093	0,073
F		0,15	0,163	0,156	0,163	0,149	0,147	0,143	0,126	0,13	0,119	0,088
G		0,144	0,164	0,154	0,152	0,167	0,163	0,156	0,148	0,150	0,108	0,115
H		0,102	0,09	0,117	0,115	0,124	0,098	0,096	0,093	0,098	0,086	0,096
Média		0,106	0,123	0,122	0,119	0,127	0,127	0,122	0,115	0,118	0,097	0,087
Variância		0,000928	0,000969	0,000564	0,000904	0,000589	0,000602	0,000497	0,00043	0,00028	0,000223	0,000355
Teste F			1,044550	1,644066	1,026226	1,574333	1,542142	1,867596	2,159767	3,311496	4,158784 ^d	2,611913
Variância Ponderada			0,015400	0,013658	0,015133	0,013772	0,013828	0,013345	0,013027	0,012289	0,011995	0,012665
Teste T			1,079569	1,162318	0,825991	1,533912	1,500611	1,142721	0,690886	0,976488	0,739887	1,529819
Diferença em relação ao controle positivo			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); ^dT tabelado para variâncias diferentes = 2,20 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 11 graus de liberdade); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA NATIVA DE GUAR (GN) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,145	0,164	0,165	0,150	0,164	0,148	0,140	0,147	0,143	0,135	0,125
B		0,100	0,111	0,124	0,118	0,112	0,115	0,107	0,107	0,097	0,098	0,079
C		0,126	0,151	0,156	0,149	0,155	0,157	0,154	0,132	0,130	0,124	0,104
D		0,108	0,117	0,111	0,113	0,117	0,114	0,105	0,099	0,103	0,103	0,076
E		0,113	0,113	0,116	0,121	0,125	0,109	0,103	0,111	0,102	0,095	0,078
F		0,15	0,163	0,159	0,163	0,159	0,156	0,143	0,143	0,135	0,118	0,103
G		0,171	0,171	0,171	0,158	0,172	0,157	0,166	0,160	0,139	0,128	0,122
H		0,146	0,137	0,148	0,134	0,148	0,12	0,118	0,131	0,123	0,117	0,091
Média		0,132	0,141	0,144	0,138	0,144	0,135	0,130	0,129	0,122	0,115	0,097
Variância		0,000601	0,000613	0,000547	0,000374	0,000523	0,000474	0,000595	0,000457	0,000335	0,000214	0,000379
Teste F			1,019734	1,098857	1,605602	1,149146	1,267593	1,009572	1,313720	1,791259	2,812354	1,583835
Variância Ponderada			0,012316	0,011977	0,011040	0,011852	0,011591	0,012227	0,011501	0,010818	0,010090	0,011069
Teste T			0,690141	0,949722	0,532156	0,980875	0,183329	0,235137	0,315188	1,005250	1,746760	3,173254
Diferença em relação ao controle positivo			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	26,5% (intervalo de confiança = 8,6-44,4% menos células)

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA DE GUAR (GS) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,157	0,146	0,162	0,161	0,158	0,146	0,153	0,153	0,147	0,129	0,118
B		0,094	0,087	0,092	0,103	0,098	0,102	0,097	0,103	0,100	0,094	0,105
C		0,140	0,139	0,132	0,123	0,137	0,135	0,141	0,143	0,136	0,121	0,125
D		0,096	0,097	0,094	0,095	0,102	0,102	0,096	0,110	0,113	0,111	0,108
E		0,102	0,100	0,102	0,101	0,105	0,114	0,110	0,108	0,106	0,100	0,106
F		0,142	0,142	0,143	0,15	0,146	0,147	0,147	0,146	0,147	0,135	0,129
G		0,168	0,165	0,164	0,163	0,162	0,167	0,157	0,171	0,159	0,147	0,137
H		0,15	0,14	0,134	0,144	0,139	0,154	0,145	0,148	0,15	0,132	0,126
Média		0,131	0,127	0,128	0,130	0,131	0,133	0,131	0,135	0,132	0,121	0,119
Variância		0,0008633	0,000796	0,000837	0,000784	0,000660	0,000607	0,000648	0,000622	0,000511	0,000332	0,000142
Teste F			1,084507	1,031758	1,100706	1,307734	1,422564	1,332938	1,388688	1,688190	2,596992	6,070191 ^d
Variância Ponderada			0,014402	0,014577	0,014351	0,013799	0,013556	0,013743	0,013624	0,013108	0,012225	0,011211
Teste T			0,286425	0,222951	0,078393	0,018117	-0,165979	0,027287	0,302774	0,085823	0,817971	1,059233
Diferença em relação ao controle positivo			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); ^dT tabelado para variâncias diferentes = 2,23 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 10 graus de liberdade); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA DE GUAR (GS) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,190	0,176	0,187	0,176	0,183	0,168	0,179	0,176	0,188	0,164	0,131
B		0,117	0,109	0,112	0,110	0,109	0,106	0,129	0,126	0,127	0,115	0,064
C		0,162	0,169	0,159	0,146	0,149	0,153	0,172	0,163	0,162	0,153	0,107
D		0,113	0,102	0,112	0,104	0,108	0,104	0,107	0,116	0,121	0,108	0,081
E		0,117	0,122	0,117	0,116	0,113	0,115	0,116	0,113	0,123	0,104	0,083
F		0,172	0,162	0,175	0,167	0,158	0,15	0,163	0,164	0,158	0,135	0,101
G		0,195	0,190	0,187	0,176	0,175	0,176	0,182	0,167	0,173	0,152	0,124
H		0,169	0,151	0,139	0,143	0,145	0,151	0,132	0,12	0,119	0,11	0,103
Média		0,154	0,148	0,149	0,142	0,143	0,140	0,148	0,143	0,146	0,130	0,099
Variância		0,001144	0,001072	0,001075	0,000871	0,000881	0,000792	0,000891	0,000708	0,000734	0,000568	0,000505
Teste F			1,066881	1,064311	1,313305	1,298294	1,443934	1,283725	1,616813	1,559204	2,012598	2,263710
Variância Ponderada			0,016644	0,016654	0,015871	0,015910	0,015557	0,015950	0,015213	0,015320	0,014630	0,014359
Teste T			0,405545	0,352769	0,763983	0,746367	0,899896	0,431045	0,739489	0,522185	1,657506	3,839181
Diferença em relação ao controle positivo			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	35,7% (intervalo de confiança= 15,8-55,6% menos células)

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 9 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA NATIVA DE LEUCENA (LN) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,109	0,163	0,168	0,169	0,150	0,160	0,165	0,158	0,152	0,126	0,134
B		0,095	0,121	0,125	0,132	0,111	0,117	0,109	0,107	0,113	0,115	0,095
C		0,142	0,155	0,163	0,172	0,159	0,146	0,161	0,149	0,137	0,137	0,146
D		0,112	0,114	0,135	0,129	0,114	0,120	0,116	0,117	0,115	0,111	0,101
E		0,101	0,112	0,119	0,137	0,109	0,113	0,105	0,113	0,112	0,116	0,100
F		0,131	0,167	0,171	0,171	0,163	0,162	0,151	0,154	0,153	0,142	0,131
G		0,147	0,181	0,180	0,185	0,174	0,169	0,162	0,156	0,151	0,140	0,102
H		0,087	0,134	0,141	0,147	0,135	0,151	0,121	0,095	0,094	0,113	0,088
Média		0,116	0,143	0,150	0,155	0,139	0,142	0,136	0,131	0,128	0,125	0,112
Variância		0,00049	0,000704	0,000532	0,000462	0,000664	0,0005	0,000669	0,000657	0,000517	0,000169	0,000462
Teste F			1,436444	1,085519	1,061389	1,353693	1,019668	1,364073	1,339999	1,053577	2,908475	1,062251
Variância Ponderada			0,012220	0,011305	0,010910	0,012010	0,011126	0,012037	0,011975	0,011219	0,009075	0,010908
Teste T			2,281167	3,073747	3,643466	1,987874	2,404386	1,723884	1,304766	1,147657	1,046822	0,309412
Diferença em relação ao controle positivo			24,1% (intervalo de confiança= 1,5-46,8% mais células)	30,1% (intervalo de confiança= 9,1-51,0% mais células)	34,4% (intervalo de confiança= 14,2-54,7% mais células)	ENS	23,2% (intervalo de confiança= 2,6-43,8% mais células)	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 10 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA NATIVA DE LEUCENA (LN) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,172	0,158	0,166	0,164	0,150	0,149	0,155	0,146	0,140	0,13	0,124
B		0,136	0,122	0,123	0,125	0,133	0,110	0,127	0,124	0,103	0,102	0,102
C		0,134	0,155	0,153	0,147	0,156	0,142	0,157	0,140	0,133	0,113	0,109
D		0,109	0,113	0,114	0,122	0,130	0,119	0,121	0,126	0,118	0,111	0,104
E		0,119	0,117	0,114	0,125	0,130	0,114	0,121	0,131	0,116	0,107	0,107
F		0,151	0,145	0,15	0,156	0,15	0,144	0,143	0,142	0,147	0,122	0,118
G		0,156	0,158	0,158	0,155	0,163	0,149	0,155	0,152	0,148	0,138	0,123
H		0,142	0,134	0,129	0,137	0,152	0,143	0,134	0,132	0,119	0,123	0,122
Média		0,140	0,138	0,138	0,141	0,146	0,134	0,139	0,137	0,128	0,118	0,114
Variância		0,000408	0,000354	0,00043	0,000268	0,000162	0,000271	0,000238	9,86E-05	0,000269	0,000148	8,26E-05
Teste F			1,154868	1,052818	1,525649	2,516615	1,508243	1,713055	4,144048 ^d	1,520678	2,760864	4,947220 ^e
Variância Ponderada			0,009760	0,010237	0,009193	0,008446	0,009214	0,008992	0,007961	0,009199	0,008339	0,007834
Teste T			0,217726	0,146525	0,163166	0,665986	0,664742	0,083409	0,408263	1,290892	2,593172	3,350807
Diferença em relação ao controle positivo			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	15,5% (intervalo de confiança= 2,7-28,2% menos células)	18,8% (intervalo de confiança= 6,3-31,3% menos células)

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); ^dT tabelado para variâncias diferentes = 2,20 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 11 graus de liberdade); ^eT tabelado para variâncias diferentes = 2,23 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 10 graus de liberdade); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 11 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA A DE LEUCENA (LSA) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,150	0,142	0,150	0,126	0,126	0,110	0,115	0,092	0,101	0,074	0,087
B		0,112	0,125	0,121	0,113	0,117	0,094	0,095	0,075	0,080	0,061	0,061
C		0,126	0,144	0,143	0,133	0,143	0,134	0,138	0,116	0,111	0,07	0,075
D		0,099	0,123	0,124	0,115	0,115	0,119	0,111	0,103	0,099	0,066	0,056
E		0,111	0,128	0,127	0,121	0,118	0,116	0,114	0,115	0,103	0,073	0,062
F		0,132	0,146	0,153	0,147	0,140	0,144	0,135	0,132	0,126	0,098	0,09
G		0,145	0,161	0,157	0,146	0,143	0,123	0,121	0,126	0,114	0,088	0,095
H		0,122	0,127	0,133	0,129	0,120	0,114	0,106	0,105	0,099	0,08	0,084
Média		0,125	0,137	0,139	0,129	0,128	0,119	0,117	0,108	0,104	0,076	0,076
Variância		0,0003023	0,0001789	0,0001977	0,0001648	0,0001502	0,0002294	0,000205	0,0003417	0,0001813	0,0001454	0,000223
Teste F			1,690398	1,529175	1,834745	2,012723	1,318205	1,474957	1,130232	1,667917	2,079979	1,353616
Variância Ponderada			0,007756	0,007906	0,007641	0,007521	0,008152	0,007963	0,008973	0,007775	0,007481	0,008106
Teste T			1,590782	1,750226	0,534916	0,410503	0,663912	0,977915	1,857052	2,641472	6,471582	5,972206
Diferença em relação ao controle positivo			ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	16,5% (intervalo de confiança= 3,1-29,8% menos células)	38,8% (intervalo de confiança= 26,0-51,7% menos células)	38,8% (intervalo de confiança= 24,9-52,8% menos células)

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 12 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA A DE LEUCENA (LSA) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,165	0,146	0,109	0,101	0,082	0,066	0,069	0,075	0,081	0,094	0,0104
B		0,116	0,118	0,089	0,082	0,044	0,046	0,042	0,042	0,044	0,074	0,081
C		0,148	0,154	0,131	0,114	0,091	0,093	0,077	0,076	0,075	0,086	0,085
D		0,117	0,115	0,106	0,088	0,082	0,061	0,052	0,073	0,062	0,078	0,074
E		0,117	0,114	0,106	0,092	0,071	0,068	0,060	0,055	0,054	0,075	0,074
F		0,156	0,144	0,138	0,128	0,099	0,099	0,096	0,081	0,085	0,097	0,093
G		0,169	0,148	0,131	0,117	0,097	0,096	0,097	0,086	0,080	0,093	0,097
H		0,144	0,125	0,097	0,095	0,078	0,075	0,071	0,052	0,064	0,074	0,091
Média		0,142	0,133	0,113	0,102	0,081	0,076	0,071	0,068	0,068	0,084	0,076
Variância		0,000488	0,0002757	0,0003168	0,0002558	0,0003083	0,000358	0,000380	0,000247	0,000211	0,000096	0,000767
Teste F			1,770984	1,541115	1,908564	1,583874	1,363927	1,283997	1,975723	2,317485	5,094839 ^d	1,571537
Variância Ponderada												
			0,009772	0,010032	0,009644	0,009979	0,010285	0,010420	0,009588	0,009347	0,008545	0,012528
Teste T			0,869796	2,803534	4,082654	6,113114	6,416976	6,813976	7,718030	7,849827	6,743774	5,254149
Diferença em relação ao controle positivo			ENS	19,9% (intervalo de confiança= 4,7-35,0% menos células)	27,8% (intervalo de confiança= 13,2-42,4% menos células)	43,1% (intervalo de confiança= 28,0-58,2% menos células)	46,6% (intervalo de confiança= 31,1-62,2% menos células)	50,1% (intervalo de confiança= 34,3-65,9% menos células)	52,3% (intervalo de confiança= 37,8-67,8% menos células)	51,8% (intervalo de confiança= 37,8-66,0% menos células)	40,7% (intervalo de confiança= 27,3-54,2% menos células)	46,5% (intervalo de confiança= 27,6-65,5% menos células)

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); ^dT tabelado para variâncias diferentes = 2,23 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 10 graus de liberdade); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 13 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA B DE LEUCENA(LSB) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,144	0,128	0,126	0,120	0,115	0,107	0,097	0,102	0,080	0,081	0,088
B		0,104	0,103	0,108	0,101	0,090	0,090	0,088	0,077	0,064	0,057	0,065
C		0,114	0,134	0,136	0,124	0,122	0,108	0,110	0,086	0,082	0,076	0,078
D		0,101	0,123	0,100	0,101	0,096	0,090	0,089	0,093	0,071	0,053	0,058
E		0,095	0,119	0,100	0,089	0,107	0,096	0,102	0,071	0,072	0,063	0,066
F		0,117	0,149	0,131	0,13	0,131	0,116	0,116	0,105	0,089	0,083	0,08
G		0,115	0,151	0,129	0,138	0,135	0,133	0,120	0,117	0,091	0,084	0,082
H		0,115	0,13	0,112	0,126	0,112	0,108	0,104	0,08	0,074	0,074	0,073
Média		0,113	0,130	0,118	0,116	0,114	0,106	0,103	0,091	0,078	0,071	0,074
Variância		0,000219	0,0002457	0,0002088	0,0002913	0,0002494	0,0002071	0,0001379	0,0002483	8,670E-05	0,0001471	0,0001019
Teste F			1,120531	1,050205	1,328366	1,137552	1,058534	1,589720	1,132258	2,529145	1,490351	2,151191
Variância Ponderada			0,007624	0,007315	0,007989	0,007654	0,007301	0,006682	0,007645	0,006184	0,006768	0,006336
Teste T			2,164308	0,632277	0,375537	0,048993	0,975924	1,477844	2,845096	5,699920	6,169188	6,214128
Diferença em relação ao controle positivo			14,6% (intervalo de confiança= 1,6-29,0% mais células)	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	19,2% (intervalo de confiança = 4,8-33,7% menos células)	31,2% (intervalo de confiança = 19,5-42,8% menos células)	36,9% (intervalo de confiança = 27,3-56,2% menos células)	34,8% (intervalo de confiança= 22,8-46,8% menos células)

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 14 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA B DE LEUCENA (LSB) SOBRE CÉLULAS VERO PELO MÉTODO DO MTT – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	0,245 ^c	0,488 ^c	0,976 ^c	1,953 ^c	3,906 ^c	7,812 ^c	15,625 ^c	31,25 ^c	62,5 ^c	125,0 ^c
A	0,000	0,152	0,168	0,152	0,129	0,117	0,106	0,104	0,103	0,096	0,096	0,093
B		0,119	0,120	0,122	0,109	0,085	0,075	0,073	0,074	0,070	0,067	0,058
C		0,143	0,163	0,145	0,140	0,111	0,101	0,105	0,097	0,094	0,082	0,073
D		0,104	0,128	0,137	0,121	0,093	0,080	0,073	0,070	0,068	0,066	0,065
E		0,112	0,130	0,131	0,121	0,094	0,093	0,077	0,067	0,070	0,074	0,061
F		0,137	0,16	0,156	0,155	0,116	0,113	0,097	0,097	0,095	0,093	0,088
G		0,148	0,170	0,161	0,143	0,119	0,116	0,103	0,098	0,100	0,105	0,084
H		0,136	0,135	0,134	0,116	0,101	0,095	0,079	0,084	0,08	0,09	0,089
Média		0,131	0,147	0,142	0,129	0,105	0,097	0,089	0,086	0,084	0,084	0,076
Variância		0,00031	0,000417	0,000182	0,000241	0,000168	0,000215	0,000214	0,000206	0,000184	0,000203	0,000192
Teste F			1,345788	1,699628	1,283146	1,843431	1,439612	1,448267	1,505992	1,687226	1,527883	1,613152
Variância Ponderada												
			0,009529	0,007841	0,008299	0,007727	0,008100	0,008090	0,008026	0,007852	0,008003	0,007919
Teste T			1,613421	1,386855	0,256040	3,477903	4,197765	5,253646	5,622320	6,017461	5,903985	6,945362
Diferença em relação ao controle positivo			ENS	ENS	ENS	20,5% (intervalo de confiança = 7,9-33,0% menos células)	25,9% (intervalo de confiança = 12,7-39,1% menos células)	32,4% (intervalo de confiança = 19,2-45,5% menos células)	34,4% (intervalo de confiança = 21,3-47,4% menos células)	36,0% (intervalo de confiança = 23,2-48,8% menos células)	36,0% (intervalo de confiança = 22,9-49,0% menos células)	41,9% (intervalo de confiança = 29,0-54,8% menos células)

^aControle negativo = poço sem células; ^bControle positivo = poço com células e sem polissacarídeos; ^cConcentração em µg/poço (0,245-125 µg/poço); F tabelado = 3,79 (7 graus de liberdade de numerador e 7 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,14 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 14 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 15 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA DE GUAR (GS) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	GN80 ^c (16 µg/poço)	GS80 ^c (16 µg/poço)	GS40 ^c (8 µg/poço)	GS20 ^c (4 µg/poço)	GS10 ^c (2 µg/poço)
A	0	-	1	4	5	14	45
B		84	0	4	5	10	44
C		105	0	5	3	13	30
D		90	0	4	4	9	46
Média		93,0	0,2	4,2	4,2	11,5	41,2
Variância		117	0,25	0,25	0,9166667	5,6666667	56,916667
Teste F			468,00000 ^d	468,00000 ^d	127,63636 ^d	20,647059 ^d	2,055637
Variância Ponderada			5,233307	5,233307	5,255553	5,411408	6,871742
Teste T			17,723020	16,958685	16,886902	15,060776	7,530842
Diferença em relação ao controle positivo		ENS	99,7% (intervalo de confiança= 75,5-123,9% menos UFP)	95,4% (intervalo de confiança= 71,2-119,6% menos UFP)	95,4% (intervalo de confiança= 71,2-119,7% menos UFP)	87,6% (intervalo de confiança= 62,6-112,7% menos UFP)	55,6% (intervalo de confiança= 36,7-74,6% menos UFP)

^aControle negativo = poço sem vírus; ^bControle positivo = poço com vírus (~100 UFP/poço); ^cConcentração em µg/mL (80-10 µg/mL ou 16-2 µg/poço); ^dT tabelado para variâncias diferentes = 4,3 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 2 graus de liberdade); F tabelado = 9,28 (3 graus de liberdade de numerador e 2 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,57 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 5 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 16 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA DE GUAR (GS) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	GN20 ^c (16 µg/poço)	GS20 ^c (16 µg/poço)	GS10 ^c (8 µg/poço)	GS5 ^c (4 µg/poço)	GS2,5 ^c (2 µg/poço)
A	0	-	56	45	69	70	76
B		74	71	75	63	71	70
C		62	57	77	74	81	71
D		81	73	77	67	79	80
Média		72,3	64,2	68,5	68,2	75,2	74,2
Variância		92,33333	80,916667	246,33333	20,916667	30,916667	21,583333
Teste F			1,141092	2,667870	4,414343	2,986523	4,277992
Variância Ponderada			7,061535	10,380805	5,372642	5,689049	5,394313
Teste T			1,144699	0,369271	0,760023	0,512681	0,355312
Diferença em relação ao controle positivo		ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem vírus; ^bControle positivo = poço com vírus (~100 UFP/poço);

^cConcentração em µg/mL (20-2,5 µg/mL ou 16-2 µg/poço); F tabelado = 9,28 (3 graus de liberdade de numerador e 2 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,57 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 5 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 17 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA A DE LEUCENA (LSA) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	LN20 ^c (4 µg/poço)	LSA20 ^c (4 µg/poço)	LSA10 ^c (2 µg/poço)	LSA5 ^c (1 µg/poço)	LSA2,5 ^c (0,5 µg/poço)
A	0	-	120	2	4	6	7
B	0	-	97	1	6	5	7
C	0	-	93	1	3	4	9
D		86	95	2	3	1	5
E		89	85	3	2	4	6
F		90	81	1	2	3	9
G		108	73	1	2	6	4
H		82	100	2	1	5	3
I		90	100	3	1	3	8
J		107	70	2	2	3	3
K		84	101	0	2	2	4
L		86	110	1	4	1	4
Média		91,3	93,8	1,6	2,7	3,6	5,8
Variância		91,25	211,840909	0,8106061	2,0606061	2,9924242	4,9318182
Teste F			2,321544	112,57009 ^d	44,283088 ^d	30,493671 ^d	18,502304 ^g
Variância Ponderada			5,596280	2,749911	2,775379	2,794213	2,833011
Teste T			0,431834	32,637415	31,947588	31,404191	30,209321
Diferença em relação ao controle positivo		ENS	ENS	98,3% (intervalo de confiança= 91,3-105,2% menos UFP)	97,1% (intervalo de confiança= 90,1-104,1% menos UFP)	96,1% (intervalo de confiança= 89,0-103,1% menos UFP)	93,7% (intervalo de confiança= 86,7-100,7% menos UFP)

^aControle negativo = poço sem vírus; ^bControle positivo = poço com vírus (~100 UFP/poço); ^cConcentração em µg/mL (20-2,5 µg/mL ou 4-0,5 µg/poço); ^dT tabelado para variâncias diferentes = 2,31 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 8 graus de liberdade); ^gT tabelado para variâncias diferentes = 2,26 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 9 graus de liberdade); F tabelado = 3,35 (10 graus de liberdade de numerador e 8 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,09 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 19 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 18 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA A DE LEUCENA (LSA) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	LN5 ^c (4 µg/poço)	LSA5 ^c (4 µg/poço)	LSA2,5 ^c (2 µg/poço)	LSA1,2 ^c (1 µg/poço)	LSA0,6 ^c (0,5 µg/poço)
A	0	-	92	84	89	92	100
B	0	-	85	76	102	102	99
C	0	-	103	73	111	91	95
D		98	104	62	91	106	100
E		92	84	84	82	83	90
F		90	115	88	96	110	87
G		100	100	68	100	112	82
H		110	115	106	93	100	78
I		99	106	81	76	78	66
J		103	102	86	95	79	85
K		62	91	62	80	83	79
L		87	91	72	64	97	86
Média		93,4	99,0	78,5	89,9	94,4	87,2
Variância		188,0278	110	154,81818	162,99242	142,44697	106,38636
Teste F			1,709343	1,214507	1,153598	1,319984	1,767405
Variância Ponderada			5,270401	5,729088	5,808842	5,606227	5,231666
Teste t			1,0541049	2,6085207	0,6073117	0,1734183	1,184029
Diferença em relação ao controle positivo		ENS	ENS	16,0% (intervalo de confiança= 3,2-28,8% menos UFP)	ENS	ENS	ENS

^aControle negativo = poço sem vírus; ^bControle positivo = poço com vírus (~100 UFP/poço); ^cConcentração em µg/mL (5-0,6 µg/mL ou 4-0,5 µg/poço);); F tabelado = 3,35 (10 graus de liberdade de numerador e 8 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,09 (α= 0,05, bilateral, 19 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.
Fonte: O autor (2008)

TABELA 18 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA B DE LEUCENA (LSB) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO DURANTE A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	LN20 ^c (4 µg/poço)	LSB20 ^c (4 µg/poço)	LSB10 ^c (2 µg/poço)	LSB5 ^c (1 µg/poço)	LSB2,5 ^c (0,5 µg/poço)
A	0	-	117	4	4	7	13
B	0	-	120	3	4	3	15
C	0	-	104	3	7	6	15
D		111	107	2	5	6	13
E		112	92	4	7	9	14
F		102	116	2	6	4	13
G		106	114	4	3	9	19
H		114	112	3	5	6	14
I		108	101	2	6	7	20
J		96	108	4	4	8	12
K		109	99	4	9	11	15
L		109	112	3	5	5	14
Média		107,4	108,5	3,2	5,4	6,8	14,8
Variância		30,52778	68,8181818	0,6969697	2,81060606	5,11363636	5,8409091
Teste F			2,254281	43,800725 ^d	10,861635 ^e	5,969877 ^f	5,226546 ^g
Variância Ponderada			3,201004	1,605556	1,678019	1,753570	1,776761
Teste T			0,329758	64,948076	60,802505	57,422537	52,170465
Diferença em relação ao controle positivo		ENS	ENS	97,0% (intervalo de confiança= 93,6-100,5% menos UFP)	95,0% (intervalo de confiança= 91,4-98,5% menos UFP)	93,7% (intervalo de confiança= 90,1-97,4% menos UFP)	86,3% (intervalo de confiança= 82,6-89,9% menos UFP)

^aControle negativo = poço sem vírus; ^bControle positivo = poço com vírus (~100 UFP/poço); ^cConcentração em µg/mL (20-2,5 µg/mL ou 4-0,5 µg/poço); ^d T tabelado para variâncias diferentes = 2,31 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 8 graus de liberdade); ^e T tabelado para variâncias diferentes = 2,26 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 9 graus de liberdade); ^f T tabelado para variâncias diferentes = 2,23 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 10 graus de liberdade); ^g T tabelado para variâncias diferentes = 2,20 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 11 graus de liberdade); F tabelado = 3,35 (10 graus de liberdade de numerador e 8 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,09 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 19 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.

Fonte: O autor (2008)

TABELA 19 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DA GALACTOMANANA SULFATADA DE LEUCENA (LSB) CONTRA O HSV-1 PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS (UFP) APÓS COLORAÇÃO COM CRISTAL VIOLETA – EXPERIMENTO APÓS A ADSORÇÃO

	CN ^a	CP ^b	LN5 ^c (4 µg/poço)	LSB5 ^c (4 µg/poço)	LSB2,5 ^c (2 µg/poço)	LSB1,2 ^c (1 µg/poço)	LSB0,6 ^c (0,5 µg/poço)
A	0	-	98	115	117	108	119
B	0	-	89	98	103	109	113
C	0	-	122	89	81	105	115
D		116	87	111	90	105	115
E		118	113	110	103	105	107
F		120	100	104	113	115	92
G		121	105	98	104	92	112
H		108	108	99	94	84	95
I		112	108	84	89	106	105
J		117	110	90	112	96	101
K		111	104	116	107	100	98
L		84	100	85	86	94	112
Média		111,9	103,7	99,9	99,9	101,6	107,0
Variância		127,8611	95,878788	129,90152	136,26515	74,810606	77,090909
Teste F			1,333570	1,015958	1,065728	1,709131	1,658576
Variância Ponderada			4,611023	5,009149	5,080153	4,346242	4,375674
Teste t			1,783167	2,390071	2,356666	2,371141	1,117288
Diferença em relação ao controle positivo		ENS	ENS	10,7% (intervalo de confiança= 1,3-20,0% menos UFP)	10,7% (intervalo de confiança= 1,2-20,2% menos UFP)	9,2% (intervalo de confiança= 1,1-17,3% menos UFP)	ENS

^aControle negativo = poço sem vírus; ^bControle positivo = poço com vírus (~100 UFP/poço); ^cConcentração em µg/mL (5-0,6 µg/mL ou 4-0,5 µg/poço); F tabelado = 3,35 (10 graus de liberdade de numerador e 8 graus de liberdade de denominador); T tabelado para variâncias iguais = 2,09 ($\alpha = 0,05$, bilateral, 19 graus de liberdade); ENS = diferença estatisticamente não significativa.
Fonte: O autor (2008)