

LUCY ONO

**Atividade Antiviral de Galactomananas Modificadas por
Oxidação e/ou Sulfatação**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e de Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Rita Sierakowski

CURITIBA

2004

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski



QUINO. **Toda Mafalda**. São Paulo: Martins Fontes, 1993.

Dedico este trabalho aos meus amigos da infância que não puderam estudar enquanto eu pude.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Yoshiharu e Eliza e aos meus irmãos Betty e Décio, obrigada por tudo, sempre.

À Profa. Maria Rita Sierakowski pela sabedoria com que conduz o seu ofício de orientar, dando liberdade para pensar, independência para caminhar, humanidade para conversar, ética para ser seguida, paixão para ser contagiada, alegria para ser compartilhada, coisas que sempre me farão lembrar desses nossos 9 anos de convivência com carinho.

Aos meus avós Fumiko e Ryoji pelo imenso entusiasmo com que sempre acompanharam meu trabalho e às tias Etsuko e Kazumi, por serem minha família em Curitiba. A minha família em São Paulo, também entusiasmada (em especial, com os experimentos em camundongos), tia Aiko, tio Nao, Renata, Roberto e Rogério. A minha segunda família em São Paulo, Dona Elza e Seu Penna, por todas as vezes que me receberam em sua casa com carinho.

À Betty por ser a melhor irmã que alguém pode ter.

À Paulinha por ser a melhor amiga que alguém pode ter. Os melhores pais, irmãos e amigos não precisam de grandes definições, cabem dentro das do coração.

Aos amigos Sandra, Karine e Rilton, que por motivos muito próprios (as risadas, as conversas, os apoios, típicos de Sandra e Rilton) também já têm um pedaço grande do coração.

À Rosângela, a pessoa mais entusiasmada que já conheci em toda a minha vida, desejando que seus sonhos se realizem.

Ao Luciano, porque cresci e porque me contagiou com a paixão pelo viajar.

Ao Wagner Wollinger e ao Moises Kestring, meus amigos e alunos de iniciação científica, que acrescentaram força a esse trabalho, com os quais sinto grande orgulho de ter podido trabalhar.

Aos amigos do laboratório, Francine, Cristiane, Milena, Gustavo, Adriana, Neoli, Helena e Nery, por serem a grande família Biopol.

Aos queridos amigos de Fortaleza, Durcilene, Jeanny, Cristina, Leônia, Elisane, Kirley, Daniel Pontes e Daniel Uchoa, para quem vale a definição “longe dos olhos mas perto do coração”, pelas noites de cachorro-quente com molho de alho – risada - conversa boa, por ter visto todos os lançamentos de filmes no cinema no período de março a setembro de 2003, por ter conhecido o suco de cajá, por ter virado fã da feirinha da Beira-mar e pelo sentimento de esperança que o time do Fortaleza fez nascer em mim.

À Angela Preto, Elisa e Ney, do TECPAR, por serem em grande parte responsáveis pelo gosto que tomei pelos experimentos de atividade biológica, ensinando o cultivo celular, discutindo idéias, apontando sugestões, quando esse trabalho de verdade começou, durante o estágio de Iniciação Científica.

Ao Prof. Yasuyoshi Hayashi, por ser a pessoa que mais gosta de vírus que conheço, pelas muitas conversas, com uma humanidade muito próxima da Profa. Rita, pelo incentivo sempre.

À Profa. Glaci T. Zancan, uma professora entre os quatro professores que nunca esquecerei, desde o dia em que trouxe o modelo molecular de uma proteína montado por ela para a sala de aula de graduação.

À Profa. Maria Berenice Steffens, pelo incentivo sempre presente nesta jornada.

Ao Prof. Edilberto R. Silveira, do CENAREMN – UFC, pela paixão com que ensina a Ressonância Magnética Nuclear a nós, seus alunos, e pela admiração, resultado dessa paixão, que nos desperta.

Ao Daniel Esdras de Andrade Uchoa, do CENAUREMN – UFC, além de ser companheiro de cachorro-quente, por tudo que me ensinou, com grande orgulho de ter aprendido com o melhor operador de RMN do Brasil e pela obtenção dos espectros de RMN bidimensionais de correlação homonuclear das galactomananas nativas e sulfatadas (pré-despolimerização) de *M. scabrella* e de *L. leucocephala*.

Às Professoras Judith P.A. Feitosa, Regina C.M. Paula, Nágila Ricardo e Sandra Soares, do Laboratório de Polímeros – DQOI – UFC que me receberam com carinho em minha estada em Fortaleza.

A todos os amigos do Laboratório de Polímeros da UFC, Sara, Marília, Mariana, Pablyana, Elenir, Júnior, Neto, Célio, Rafael, Emanuel e Nízia, pelos almoços com conversa na longa mesa-família do laboratório.

Ao Prof. Philip A.J. Gorin e ao Prof. Miguel D. Nosedá, pela correção do projeto de tese e dos relatórios de atividades, pelas sugestões e em especial ao Prof. Gorin pela confiança depositada neste trabalho.

Ao César Tischer, pela obtenção do espectro de RMN-¹³C da galactomanana nativa de *M. scabrella*.

Ao Prof. Guilherme L. Sasaki, pelo auxílio e apoio na utilização do espectrômetro de RMN de 400 MHz do Depto. de Bioquímica – UFPR, fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Andréia T. C. Capeline, pelas palavras amigas de sempre e pelas análises de GLC dos acetatos de alditóis das amostras hidrolisadas das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala*, bem como pelas análises de homogeneidade e de determinação da massa molar por HPSEC-MALLS.

À Iray M. Rocco e à T. Lisieux M. Coimbra, da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos, que como colaboradoras sempre presentes, me deram a oportunidade de realizar um sonho, permitindo a utilização da infra-estrutura do Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP) para a realização dos experimentos com arbovírus.

Ao Setor de Cultivo de Células – IAL-SP, sob responsabilidade da Áurea e ao Biotério – IAL-SP, sob responsabilidade da Lucy, pela paciência e presteza com que sempre forneceram as muitas placas e animais utilizados nos experimentos com arbovírus.

Ao pessoal do Lutz, Antônia, Madalena, dona Izabel, seu João, Dulce, Akemi, Luís, Renato e Ivani, pelo carinho recebido.

Ao Ernesto Renato Krüger, Centro de diagnóstico Marcos Enrietti – Curitiba – PR, pela colaboração nos experimentos de atividade antiviral *in vitro* contra o vírus HSV-1.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica da UFPR, na pessoa da Profa. Fanny Reicher, pela oportunidade do doutorado direto. À Dona Marilza, por sempre trabalhar tanto e com tanto carinho por nós, os alunos da Pós.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da UFC, na pessoa da Profa. Otilia D.L.P. Cavalcante pelo aceite para cursar, na condição de aluna especial, a disciplina Tópicos Especiais em Química Orgânica (seqüências de pulsos de ressonância magnética nuclear: teoria, prática e aplicação em química).

À Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, nas pessoas da Telma e da Izabella, pela presteza e pelo auxílio inicial no levantamento bibliográfico.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado e através do PRONEX-Carboidratos, pelo apoio financeiro, fundamentais para a realização deste trabalho, bem como ao PROCAD (UFPR-UFC) pela concessão das passagens aéreas de ida e volta de Curitiba a Fortaleza.

A Deus por estar sempre em meu coração.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xx
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Galactomananas.....	1
1.2 RMN de galactomananas de leguminosas	8
1.3 <i>Mimosa scabrella</i>	16
1.4 <i>Leucaena leucocephala</i>	20
1.5 <i>Cassia fastuosa</i>	23
1.6 Oxidação seletiva do grupo hidroximetil de polissacarídeos	26
1.7 Vírus Herpes simplex tipo 1	27
1.8 Tratamento antiviral corrente contra o HSV-1	29
1.9 Dengue e febre amarela	30
1.10 Atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados	34
2. OBJETIVOS	39
2.1 Gerais	39
2.2 Específicos	39
3. METODOLOGIA	41
3.1 Extração e purificação dos polissacarídeos	41
3.2 Métodos gerais	41
3.3 Espectroscopia de infravermelho	42
3.4 Determinação da homogeneidade e da massa molar	42
3.5 Obtenção dos derivados urônicos e/ou sulfatados dos polissacarídeos a serem utilizados em testes de atividade antiviral	42
3.6 Despolimerização parcial dos derivados sulfatados por oxidação com H ₂ O ₂ -Cu ⁺⁺	44
3.7 Ressonância magnética nuclear de carbono-treze (RMN- ¹³ C) e hidrogênio (RMN- ¹ H)	44
3.8 Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>C. fastuosa</i> , <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> contra o HSV-1 <i>in vitro</i>	45

3.9	Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> em células C6/36	46
3.10	Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> contra o YFV (BeH111) e o DEN-1 (Hawaii) <i>in vitro</i>	47
3.11	Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> <i>in vivo</i>	48
3.12	Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> contra YFV (BeH111) e DEN-1 (Hawaii) <i>in vivo</i>	48
3.13	Realização de teste de desafio e determinação dos índices de neutralização contra o YFV (BeH111) do soro de camundongos tratados simultaneamente com vírus e os derivados BRS e LLS	49
3.14	Determinação da atividade anticoagulante (Tempo Parcial de Tromboplastina Ativada – APTT) das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i>	50
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Extração e purificação do polissacarídeo	51
4.2	Obtenção de polissacarídeos modificados por oxidação e/ou sulfatação e determinação da atividade antiviral <i>in vitro</i> contra o HSV-1	53
4.3	Determinação da atividade antiviral <i>in vitro</i> contra o HSV-1	55
4.4	Obtenção, purificação e análise da homogeneidade e massa molar dos derivados sulfatados utilizados em teste de atividade antiviral contra o YFV (cepa BeH111) e DEN-1 (cepa Hawaii)	59
4.5	Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> em células C6/36	63
4.6	Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> contra YFV (BeH111) e DEN-1 (Hawaii) <i>in vitro</i>	65
4.7	Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> <i>in vivo</i>	68
4.8	Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> contra YFV (BeH111) e DEN-1 (Hawaii) <i>in vivo</i>	73

4.9 Realização de teste de desafio e determinação dos índices de neutralização contra o YFV (cepa BeH111) do soro de camundongos tratados simultaneamente com vírus e os derivados BRS e LLS	76
4.10 Determinação da atividade anticoagulante (Tempo Parcial de Tromboplastina Ativada – APTT) das galactomananas nativas e sulfatadas de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i>	78
4.11 Ressonância magnética nuclear de carbono-treze (RMN- ¹³ C) e hidrogênio (RMN- ¹ H)	80
5. CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	117
A. Espectros bidimensionais da galactomanana nativa (BR), derivado sulfatado (BRS) e derivado sulfatado despolimerizado (BRSD) de sementes de <i>M. scabrella</i>.....	117
B. Espectros bidimensionais da galactomanana nativa (LL), derivado sulfatado (LLS) e derivado sulfatado despolimerizado (LLSD) de sementes de <i>L. leucocephala</i>.....	130
C. Epidemiologia da dengue e da febre amarela.....	141
D. Prováveis fatores de implicação na manifestação da febre hemorrágica do dengue.....	145
E. Artigo publicado em periódico.....	146

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição monossacarídica de algumas galactomananas de sementes de leguminosas (WHISTLER; SMART, 1953).....	2
Tabela 2: Conteúdos de manose e galactose, grau de substituição da manose (GS), grau de “blockiness” (GB) e relação de áreas de picos de manose substituída vs. não-substituída de algumas galactomananas estudadas por DAAS <i>et al.</i> (2000).....	7
Tabela 3: Deslocamentos químicos de ^1H do oligossacarídeo Gal_2Man_5 (DAVIS <i>et al.</i> , 1995).....	10
Tabela 4: Deslocamentos químicos de ^{13}C do oligossacarídeo Gal_2Man_5 (DAVIS <i>et al.</i> , 1995).....	10
Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN- ^1H e ^{13}C (ppm) da galactomanana de sementes <i>T. foenum-graecum</i> L (RAMESH <i>et al.</i> , 2001).....	15
Tabela 6: Características gerais dos membros da família <i>Herpesviridae</i>	28
Tabela 7: Rendimento de galactomananas extraídas de sementes de <i>C. fastuosa</i> , <i>L. leucocephala</i> e de <i>M. scabrella</i>	51
Tabela 8: Análise dos acetatos de alditóis dos polissacarídeos hidrolisados de sementes de <i>C. fastuosa</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>M. scabrella</i> por GLC.....	52
Tabela 9: Derivados de galactomananas sintetizados para teste de atividade antiviral contra o HSV-1.....	56
Tabela 10: Dosagens de açúcar total, proteína e sulfato dos compostos avaliados em testes de toxicidade e atividade antiviral contra YFV (cepa BeH111) e DEN-1 (cepa Hawaii).....	59
Tabela 11: Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> de galactomananas nativa e sulfatada de sementes de <i>M. scabrella</i> sobre células C6/36 pelo método do MTT.....	64
Tabela 12: Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i> de galactomananas nativa e sulfatada de sementes de <i>L. leucocephala</i> sobre células C6/36 pelo método do MTT.....	64
Tabela 13: Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> (contra o YFV – cepa BeH111) de galactomananas nativa e sulfatada de sementes de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> sobre células C6/36 em garrafas T25 por determinação do título viral.....	66
Tabela 14: Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> (contra o DEN 1 – cepa Hawaii) de galactomananas nativa e sulfatada de sementes de <i>M. scabrella</i> e de <i>L. leucocephala</i> sobre células C6/36 em garrafas T25 por determinação do título viral.....	67
Tabela 15: Determinação da porcentagem de ganho de massa média em camundongos fêmeas jovens adultas com relação à massa inicial durante a administração de solução de polissacarídeo de sementes de <i>M. scabrella</i> por via intraperitoneal.....	69

Tabela 16: Determinação da porcentagem de ganho de massa média em camundongos fêmeas jovens adultas com relação à massa inicial durante a administração de solução de polissacarídeo de sementes de <i>L. leucocephala</i> por via intraperitoneal.....	71
Tabela 17: Avaliação da atividade antiviral em camundongos fêmeas jovens adultas contra o vírus da febre amarela (cepa BeH111) por via intraperitoneal.....	74
Tabela 18: Títulos de neutralização de soros de camundongos pré-desafio contra YFV (BeH111).....	77
Tabela 19: Atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN da galactomanana nativa de sementes de <i>M. scabrella</i>	85
Tabela 20: Dados de RMN- ^{13}C e ^1H para metil α -D-galactopiranosose 6-SO ₄ (CONTRERAS <i>et al.</i> , 1988).....	86
Tabela 21: Atribuições das correlações ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HMQC de BRSD.....	88
Tabela 22: Atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i>	94
Tabela 23: Dados de RMN- ^{13}C e ^1H para metil 6-O-sulfonato- α -D-manopiranosose (BERLININD <i>et al.</i> , 1994; VIDAL <i>et al.</i> , 2002).....	96
Tabela 24: Atribuições das correlações ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HMQC de LLSD.....	98
Tabela 25: Número de casos de dengue e de febre amarela obtidos por notificação compulsória no ano de 1999 e 2000, por Unidade Federada, Brasil (BRASIL, 2003 ^c).....	144

Lista de figuras

- Figura 1:** Estrutura parcial de uma galactomana teórica totalmente substituída, com unidades de manose em ligação β -(1→4) e unidades de galactose em ligação α -(1→6).....1
- Figura 2 –** GB vs. GS de algumas galactomananas (DAAS *et al.*, 2000).....6
- Figura 3:** Região espectral de RMN-¹³C em solução, a 25 MHz, de C-4 de unidades de D-manose em A, goma de alfarrobo, B, guar e C, galactomanana de sementes de clover (GRASDALEN; PAINTER, 1980).....8
- Figura 4:** Região espectral de RMN-¹³C (75 MHz) de C-6 de unidades de D-manose substituída em galactomananas hidrolisadas por ácido fosfórico (MANZI; CEREZO; SHOOLERY, 1986).....9
- Figura 5:** Estrutura do heptassacarídeo digalactosilmanopentaose determinada por RMN (DAVIS *et al.*, 1995).....10
- Figura 6:** Expansão do espectro de ¹H-¹H COSY da galactomanana de sementes de *T. foenum-graecum* L (RAMESH *et al.*, 2001).....12
- Figura 7:** Espectro de ¹H-¹³C HSQC da galactomanana de sementes de *T. foenum-graecum* L (RAMESH *et al.*, 2001).....13
- Figura 8:** Espectro de ¹H-¹³C HMBC da galactomanana de sementes de *T. foenum-graecum* L (RAMESH *et al.*, 2001).....14
- Figura 9:** Árvore (A), flores (B), frutos (C) e sementes (D) de *M. scabrella* (LORENZI, 1998).....17
- Figura 10 –** Região de sinais de C-4 de manose em espectro de RMN-¹³C para galactomananas de sementes de *Mimosa* spp. (A) *M. scabrella*, (B) *M. bimucronata*, (C) *M. flocculosa*, (D), *M. taimbensis*. I, II e III referem-se a diferentes díades de manose (GANTER; REICHER, 1999).....19
- Figura 11:** Árvores (A), flores (B), frutos (C) e sementes (D) de *L. leucocephala* (SÁ, 1997).....22
- Figura 12:** Árvore (A), folhas e flores (B), fruto e sementes (C) de *C. fastuosa* (KRAMBECK, 1984).....24
- Figura 13:** Etapas envolvidas na oxidação de álcool primário na presença de TEMPO, hipobromito e hipoclorito de sódio (de NOOY *et al.*, 1994).....26
- Figura 14:** Fotomicrografia eletrônica do HSV-1, mostrando nucleocapsídeo (1), estroma (2) e envoltório lipídico (3) (<http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/herpes.html>).....27
- Figura 15:** Diagrama representativo da transcrição, translação e replicação do DNA de HSV (FENNER *et al.*, 1993).....29

Figura 16: Estrutura do aciclovir (A) e estrutura do ganciclovir (B) (SANDER, 2001).....	30
Figura 17: Genoma dos flavivírus (LEYSSSEN <i>et al.</i> , 2000).....	31
Figura 18: Fotomicrografia eletrônica de partículas virais maduras de dengue-2 sendo liberadas, com aumento original de 123000x (http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/electron-micrograph.htm).....	31
Figura 19: Diagrama esquemático da composição de flavivírus imaturos e maduros (HEINZ; ALLISON, 2001).....	32
Figura 20: Ciclo de replicação dos flavivírus (LEYSSSEN <i>et al.</i> , 2000).....	33
Figura 21: Representação esquemática baseada em micrografias eletrônicas de TMV purificado na presença (a) e na ausência (b) de condroitina (SANO, 1997).....	36
Figura 22: Perfis de oxidação a 4 °C com NaOCl, NaBr e TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) com ajuste constante de pH para 9,3 das 3 galactomananas de sementes de <i>C. fastuosa</i> , <i>L. leucocephala</i> e de <i>M. scabrella</i>	54
Figura 23: Avaliação da atividade antiviral (anti-HSV-1) de BR-S através da redução das unidades formadoras de placas (UFP) com relação a um controle. n: 4, α : 0,05. Controle Positivo: 140 UFP/poço. Concentrações das amostras (expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): 1) 670; 2) 84; 3) 10,5; 4) 3,7; 5) 1,3; 6) 0,45; 7) 0,16; 8) 0,06; 9) BR: 395.....	57
Figura 24: Avaliação da atividade antiviral (anti-HSV-1) de BROS através da redução das unidades formadoras de placas (UFP) com relação a um controle. n: 4, α : 0,05. Controle Positivo: 98 UFP/poço. Concentrações das amostras (expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): 1) 42; 2) 14; 3) 4,7; 4) 1,6; 5) LL: 109.	57
Figura 25: Avaliação da atividade antiviral (anti-HSV-1) de LL-S através da redução das unidades formadoras de placas (UFP) com relação a um controle. n: 4, α : 0,05. Controle Positivo: 140 UFP/poço. Concentrações das amostras (expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): 1) 248; 2) 31; 3) 4.....	58
Figura 26: Avaliação da atividade antiviral (anti-HSV-1) de LLOS através da redução das unidades formadoras de placas (UFP) com relação a um controle. n: 4, α : 0,05. Controle Positivo: 51 UFP/poço. Concentrações das amostras (expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): 1) 204; 2) 51; 3) 13; 4) 3,2.....	58
Figura 27: Espectros de infravermelho da galactomanana nativa (BR) e sulfatada (BRS) de sementes de <i>M. scabrella</i> em pastilhas de KBr.....	60
Figura 28: Espectros de infravermelho da galactomanana nativa (LL) e sulfatada (LLS) de sementes de <i>L. leucocephala</i> em pastilhas de KBr.....	60
Figura 29: Perfil de eluição de BR analisado por HPSEC-MALLS (1 mg.mL^{-1} em NaNO_2 0,5 g.L^{-1} contendo 0,02% de NaN_3 a 25°C; detecção por índice de refração em azul e por espalhamento de luz em vermelho).....	61

Figura 30: Perfil de eluição de BRS analisado por HPSEC-MALLS (1 mg.mL ⁻¹ em NaNO ₂ 0,5 g.L ⁻¹ contendo 0,02% de NaN ₃ a 25°C; detecção por índice de refração em azul e por espalhamento de luz em vermelho).....	62
Figura 31: Perfil de eluição de LL analisado por HPSEC-MALLS (1 mg.mL ⁻¹ em NaNO ₂ 0,5 g.L ⁻¹ contendo 0,02% de NaN ₃ a 25°C; detecção por índice de refração em azul e por espalhamento de luz em vermelho).....	62
Figura 32: Perfil de eluição de LLS analisado por HPSEC-MALLS (1 mg.mL ⁻¹ em NaNO ₂ 0,5 g.L ⁻¹ contendo 0,02% de NaN ₃ a 25°C; detecção por índice de refração em azul e por espalhamento de luz em vermelho).....	63
Figura 33: Determinação da atividade antiviral <i>in vitro</i> (contra o YFV – cepa BeH111) de galactomananas nativa e sulfatada de <i>M. scabrella</i> sobre células C6/36 em placas de 24 poços por imunofluorescência (8 dias de incubação em estufa de CO ₂ 5% a 28°C).....	65
Figura 34: Determinação da atividade antiviral <i>in vitro</i> (contra o YFV – cepa BeH111) de galactomananas nativa e sulfatada de <i>L. leucocephala</i> sobre células C6/36 em placas de 24 poços por imunofluorescência (8 dias de incubação em estufa de CO ₂ 5% a 28°C).....	65
Figura 35: Títulos virais de DEN-1 (A) e YFV (B) em função da concentração dos derivados, determinados através de titulação do sobrenadante das garrafas T25 (tratadas simultaneamente com vírus e galactomananas sulfatadas BRS ou LLS) por imunofluorescência em placas de 24 poços (8 dias de incubação em estufa de CO ₂ 5% a 28°C).....	67
Figura 36: Curvas de ganho de massa (massa inicial: 17-21 g, n: 6) após administração intraperitoneal de BR (total de 7 doses, volume administrado: 1 mL) em camundongos fêmeas de 25-30 dias.....	70
Figura 37: Curvas de ganho de massa (massa inicial: 17-21 g, n: 6) após administração intraperitoneal de BRS (total de 7 doses, volume administrado: 1 mL) em camundongos fêmeas de 25-30 dias.....	70
Figura 38: Curvas de ganho de massa (massa inicial: 17-21 g, n: 6) após administração intraperitoneal de LL (total de 7 doses, volume administrado: 1 mL) em camundongos fêmeas de 25-30 dias.....	72
Figura 39: Curvas de ganho de massa (massa inicial: 17-21 g, n: 6) após administração intraperitoneal de LLS (total de 7 doses, volume administrado: 1 mL) em camundongos fêmeas de 25-30 dias. Gráfico interno: curvas de perda de peso no 1 ^o , 3 ^o e 7 ^o dias para diferentes concentrações de LLS.....	72
Figura 40: Atividade antiviral <i>in vivo</i> de BRS e LLS a uma dose de 49 mg.kg ⁻¹ (massa do camundongo: 17-21 g, n: 3 grupos de 19 animais) avaliada pela via intraperitoneal (volume inoculado: 1 mL, tempo de observação: 14 dias).....	74
Figura 41: Experimento de desafio (n: 3 grupos de 5 animais) através de inoculação intraperitoneal de camundongos com YFV (37,5 DL50) (volume inoculado: 1 mL, tempo de observação: 50 dias).....	77

Figura 42: Análise dos tempos de coagulação do plasma em função da concentração, determinado pelo teste do APTT. São considerados incoaguláveis os plasmas com tempo de coagulação igual ou superior a 120 s. A concentração é expressa com relação ao volume de plasma utilizado.....	78
Figura 43: Espectro de RMN- ¹ H da galactomanana nativa de sementes de <i>M. scabrella</i> (BR), 20mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.....	81
Figura 44: Espectro de RMN- ¹ H da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação (BRS), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD..	81
Figura 45: Espectro de RMN- ¹ H da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 400 MHz, com pré-saturação do HOD.....	82
Figura 46: Espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana nativa de sementes de <i>M. scabrella</i> (BR), 30 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 70°C, 100 MHz.....	83
Figura 47: Espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRS), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 70°C, sonda de 10 mm, 100 MHz.....	83
Figura 48: Espectro de RMN- ¹³ C DEPT 135 da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação (BRS), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 70°C, sonda de 10 mm, 100 MHz.....	84
Figura 49: Espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 100 MHz.....	84
Figura 50: Espectro de RMN- ¹ H da galactomanana nativa de sementes de <i>L. leucocephala</i> (LL), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (¹ H: 500 MHz), com pré-saturação do HOD.....	89
Figura 51: Espectro de RMN- ¹ H da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação (LLS), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (¹ H: 500 MHz), com pré-saturação do HOD.....	89
Figura 52: Espectro de RMN- ¹ H da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (¹ H: 400 MHz), com pré-saturação do HOD.....	90
Figura 53: Espectro de RMN- ¹ H da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 30°C, (¹ H: 400 MHz).....	90
Figura 54: Espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana nativa de sementes de <i>L. leucocephala</i> (LL), 30 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 70°C, (¹³ C: 100 MHz).....	92
Figura 55: Espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação (LLS), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 70°C, sonda de 10 mm, 100 MHz.....	92

Figura 56: Espectro de RMN- ¹³ C DEPT 135 da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação (LLS), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 70°C, sonda de 10 mm, 100 MHz.....	93
Figura 57: Espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 80 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 100 MHz.....	93
Figura 58: Expansão do espectro de RMN- ¹³ C da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 80 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 100 MHz.....	93
Figura 59: Expansão da região de C-4 de manose das galactomananas nativas BR (A) e LL (B) em D ₂ O, a 70°C, 30 mg.mL ⁻¹ , 100 MHz.....	95
Figura 60: Espectro de ¹ H- ¹³ C HMQC da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz), com pré-saturação do HOD.....	118
Figura 61: Expansão do espectro de HMQC da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz), com pré-saturação do HOD.....	119
Figura 62: Espectro de ¹ H- ¹ H COSY da galactomanana nativa de sementes de <i>M. scabrella</i> (BR), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.....	120
Figura 63: Espectro de ¹ H- ¹ H COSY da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação (BRS), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.....	121
Figura 64: Espectro de ¹ H- ¹ H COSY da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 400 MHz, com pré-saturação do HOD.....	122
Figura 65: Espectro de TOCSY da galactomanana nativa de sementes de <i>M. scabrella</i> (BR), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.....	123
Figura 66: Espectro de TOCSY da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação (BRS), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.....	124
Figura 67: Espectro de TOCSY da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 400 MHz, com pré-saturação do HOD.....	125
Figura 68: Espectro de ROESY da galactomanana nativa de sementes de <i>M. scabrella</i> (BR), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.....	126
Figura 69: Espectro de ROESY da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação (BRS), 20 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.....	127

Figura 70: Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.....	128
Figura 71: Expansão do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da galactomanana de sementes de <i>M. scabrella</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.....	129
Figura 72: Espectro de ^1H - ^{13}C HMQC da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 80 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.....	131
Figura 73: Expansão do espectro de ^1H - ^{13}C HMQC da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 80 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.....	132
Figura 74: Expansão do espectro de ^1H - ^{13}C HMQC da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 80 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.....	133
Figura 75: Espectro de ^1H - ^1H COSY da galactomanana nativa de sementes de <i>L. leucocephala</i> (LL), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.....	134
Figura 76: Espectro de ^1H - ^1H COSY da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação (LLS), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.....	135
Figura 77: Espectro de TOCSY da galactomanana nativa de sementes de <i>L. leucocephala</i> (LL), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.....	136
Figura 78: Espectro de TOCSY da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação (LLS), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.....	137
Figura 79: Espectro de TOCSY da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 80 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 400 MHz), com pré-saturação do HOD.....	138
Figura 80: Espectro de ROESY da galactomanana nativa de sementes de <i>L. leucocephala</i> (LL), 15 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.....	139
Figura 81: Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da galactomanana de sementes de <i>L. leucocephala</i> modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), 80 mg.mL ⁻¹ em D ₂ O, a 50°C, (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.....	140
Figura 82: Incidência de dengue e número de municípios com o <i>Aedes aegypti</i> . Brasil, 1976-2000 (BRASIL, 2003 ^a).....	141
Figura 83: Distribuição dos municípios com febre amarela silvestre. Brasil, 1980-1998 (BRASIL, 2003 ^b).....	143

Figura 84: Febre amarela silvestre: óbitos, taxa de letalidade e cura. Brasil, 1982 a 2001 (BRASIL, 2003 ^c).....	143
---	-----

Lista de abreviaturas

δ : deslocamento químico (ppm)

APTT: tempo de tromboplastina parcial ativada

BR: galactomanana nativa de sementes de *M. scabrella*

BRO: BR modificada por oxidação

BROS: BRO modificada por sulfatação

BR-S: BR modificada por sulfatação (derivado usado nos testes contra o HSV-1)

BRS: BR modificada por sulfatação (derivado usado nos testes contra arbovírus)

BRSD: BRS despolimerizada por H_2O_2 - Cu^{++}

BRH1: BR hidrolisada parcialmente em HCl pH 1,0

BRH1O: BRH1 modificada por oxidação

BRH1OS: BRH1O modificada por sulfatação

BRH1,5: BR hidrolisada parcialmente em HCl pH 1,5

BRH1,5O: BRH1,5 modificada por oxidação

BRH1,5OS: BRH1,5O modificada por sulfatação

CF: galactomanana nativa de sementes de *C. fastuosa*

CFO: CF modificada por oxidação

CFOS: CFO modificada por sulfatação

CFS: CF modificada por sulfatação

CI50: concentração inibitória 50%

CMV: Citomegalovírus

COSY: “correlation spectroscopy”

D_2O : água deuterada

DC50: dose citotóxica 50%

DEN-1: vírus Dengue – subtipo 1

DEN-2: vírus Dengue – subtipo 2

DEPT: “distortionless enhancement by polarization transfer”

DI50: dose infectiva 50%

DL50: dose letal 50%

DL75: dose letal 75%

DS: “degree of sulfation”, grau de sulfatação

DP: “degree of polymerization”

FHD: febre hemorrágica do dengue

GB: grau de “blockiness”
GLC: “gas liquid chromatography”
GPC: “gel permeation chromatography”
GS: grau de substituição
²J: acoplamento a 2 ligações químicas
³J: acoplamento a 3 ligações químicas
HIV: vírus da Imunodeficiência humana
HMBC: “heteronuclear multiple bond coherence”
HMQC: “heteronuclear multiple quantum coherence”
HPLC: “high performance liquid chromatography”
HPSEC-MALLS: “high performance size exclusion chromatography – multi angle laser light scattering”
HPSEC-RALLS: “high performance size exclusion chromatography – right angle laser light scattering”
HSQC: “heteronuclear single quantum coherence”
HSV: vírus Herpes simplex
LL: galactomanana nativa de sementes de *L. leucocephala*
LLOS: LL modificada por oxidação e sulfatação
LL-S: LL modificada por sulfatação (derivado usado nos testes contra o HSV-1)
LLS: LL modificada por sulfatação (derivado usado nos testes contra arbovírus)
LLSD: LLS despolimerizada por H₂O₂-Cu⁺⁺
M: molar, mol.L⁻¹
M_w: massa molecular ponderal média
mRNA: RNA mensageiro
p24: proteína antígeno do HIV
PBL: “peripheral blood lymphocytes”
PFU: “plaque forming unit”
PTV: vírus Punta toro
RMN: ressonância magnética nuclear
SCD: síndrome do choque do dengue
TEMPO: 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
TLC: “thin layer chromatography”
TMV: vírus Tobacco mosaic
TOCSY: “total correlation spectroscopy”

ROESY: “rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy”

UFP: unidade formadora de placa

UTR: “untranslated ribbon”

YFV: vírus Yellow fever

RESUMO

Galactomananas extraídas de sementes de 3 espécies de leguminosas (*Mimosa scabrella*, *Leucaena leucocephala* e *Cassia fastuosa*), constituídas por uma cadeia principal de unidades de D-manopiranosose unidas por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4) e com diferentes graus de substituição em O-6 por α -D-galactose (Man/Gal 1,1, 1,4 e 2,9, respectivamente), foram derivatizadas para serem avaliadas quanto ao potencial antiviral frente ao HSV-1 (vírus Herpes simplex), em experimentos *in vitro*. Foram obtidos derivados sulfatados, urônicos (através de oxidação específica de C-6 com o reagente TEMPO – 2,2,6,6 tetrametilpiperidina-1-oxil) e urônico/sulfatados. Os derivados sulfatados e urônico/sulfatados das galactomananas mais substituídas (de *M. scabrella*, respectivamente BR-S e BROS e de *L. leucocephala*, respectivamente, LL-S e LLOS) foram os que apresentaram melhor potencial antiviral, promovendo 50% de inibição do número de UFP, nas concentrações de 0,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para BR-S (DS:1,4), 14,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para BROS (DS:0,80), 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para LL-S (DS 0,6), e de 3,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para LLOS (DS: 0,33), enquanto CFS (DS: 0,22) e CFOS (DS: 0,30), promoveram, respectivamente, 91 e 94% de inibição nas concentrações de 1131 e 1218 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir desses resultados, testou-se a atividade antiviral dos derivados sulfatados de *M. scabrella* (BRS) e de *L. leucocephala* (LLS) contra os vírus da febre amarela (YFV) e da dengue (DEN-1), em experimentos *in vitro* e *in vivo*. BRS e LLS apresentaram 15,3 e 14,3% de sulfato, respectivamente, e perfil homogêneo por HPSEC-MALLS. LLS apresentou proteção média de 96,5% e BRS, 87,8% contra o YFV *in vivo* na concentração de 1 g.L^{-1} , apesar das concentrações necessárias para reduzir em 100 vezes o título viral *in vitro* terem sido relativamente altas (BRS: 1055 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e LLS: 386 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para YFV; BRS: 347 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e LLS: 37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para DEN-1). Os camundongos inoculados com polissacarídeo + vírus desenvolveram anticorpos neutralizantes contra o YFV em títulos comparáveis aos animais inoculados com vírus inativados pelo formaldeído e, portanto, a atividade antiviral poderia estar sendo exercida por imunoestimulação. BRS e LLS previamente despolimerizadas por oxidação com $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{++}$, utilizando análise estrutural por técnicas uni e bidimensionais (COSY, TOCSY, HMQC e HMBC) de RMN- ^1H e de ^{13}C , mostraram diferenças na posição dos substituintes sulfatos nos dois derivados: BRS estaria preferencialmente sulfatada no C-6 Gal ($\delta^{13}\text{C}$: 67,5 ppm, $\delta^1\text{H}$: 4,21 ppm) e LLS, no C-6 Man ($\delta^{13}\text{C}$: 66,7 ppm, $\delta^1\text{H}$: 4,21 ppm). Portanto, diferenças estruturais na posição do substituinte sulfato e no grau de substituição por galactose poderiam explicar um potencial antiviral maior de LLS *in vivo* (contra o YFV) e *in vitro* (contra YFV e DEN-1). Assim, foram obtidos derivados sulfatados de galactomananas de fontes renováveis com bons rendimentos de extração (entre 13 e 22%) e homogeneidade, e que mostraram, após sulfatação, características interessantes como substâncias candidatas a drogas antivirais.

ABSTRACT

Galactomannans extracted from 3 leguminous seeds (*Mimosa scabrella*, *Leucaena leucocephala* and *Cassia fastuosa*) consisted of a β -D-(1 \rightarrow 4) mannan backbone substituted at O-6 by different proportions of single D-galactosyl units (Man/Gal ratio of 1.1, 1.4 and 2.9, respectively) were derivatized so that the products were evaluated for their *in vitro* antiviral potential against HSV-1 (herpes simplex virus). Sulfated, uronic (through specific oxidation of CH₂OH-6 with TEMPO – 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) and uronic/sulfated derivatives were synthesized. The sulfated and uronic/sulfated derivatives with the highest Gal:Man ratio galactomannans had the best antiviral potential against HSV-1 (BR-S and BROS from *M. scabrella*, respectively and LL-S and LLOS from *L. leucocephala*, respectively), promoting higher than 50% inhibition of the number of PFUs at concentrations of 0.38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for BR-S (DS:1.4), 14.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for BROS (DS:0.80), 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for LL-S (DS 0.6) and 3.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for LLOS (DS: 0.33). CFS (DS 0.22) and CFOS (DS 0.30), promoted 91 and 94% inhibition at concentrations of 1131 and 1218 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The sulfated derivatives of *M. scabrella* (BRS) and *L. leucocephala* (LLS) were then tested against yellow fever (YFV) and dengue viruses (DEN-1), *in vitro* and *in vivo*. The sulfate content was determined to be 15.3 and 14.3%, respectively, and showed homogeneous HPSEC-MALLS profiles. At a dose of 1 g.L⁻¹, BRS gave rise to a 87.7% death protection and 96.5% for LLS *in vivo* against YFV, despite the concentration necessary to make a 100-fold reduction in the *in vitro* viral titer being relatively high (BRS: 1055 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and LLS: 386 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for YFV; BRS: 347 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and LLS: 37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for DEN-1). Mice inoculated with polysaccharide + virus developed neutralizing antibodies against YFV, with titers comparable to those of animals inoculated with the formaldehyde inactivated virus, so that the antiviral activity could be exerted through a immunostimulatory mechanism. For the structural characterization of BRS and LLS, the positions of the sulfate groups were verified by 1D and 2D (COSY, TOCSY, HMQC and HMBC) ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. The polysaccharide with a low molecular weight produced by hydrogen peroxide – cupric redox system showed a ¹³C signal at 67.5 ppm, which correlated with an ¹H signal at 4.21 ppm in its HMQC spectrum, corresponding to sulfation at C-6 of galactose residues in the BRS spectrum. Interestingly, LLS did not contain sulfate groups in this position, probably being sulfated at C-6 of its mannosyl residues, deduced by the observation of a signal at 66.7 ppm, which correlated with one at 4.21 ppm in the HMQC spectrum. The relation structure/activity thus shows that BRS and LLS have differences in their sulfate substitution positions that could explain the differences in their antiviral activities against YFV and DEN-1. Galactomannans from renewable sources obtained in good yields (13-22%) and with homogeneity, could be an interesting source as antiviral drug candidates after sulfation.

1. INTRODUÇÃO:

1.1 Galactomananas:

Dentre os polissacarídeos de reserva presentes em plantas superiores, as galactomananas constituem o 2º maior grupo encontrado (SHCHERBUKHIN, 1993), especialmente em leguminosas, nas sementes das quais podem ser encontradas com diferentes graus de substituição e massas molares, bem como com diferentes estruturas finas (WHISTLER; SMART, 1953; DEA; MORRISON, 1975; SONI; BOSE, 1985).

A diversidade existente entre as galactomananas tem sido pouco explorada no Brasil, haja visto que as sementes constituem uma fonte renovável e não desmatadora, além de abundante para a extração desses polissacarídeos. Os rendimentos de extração muitas vezes chegam a ser superiores a 30% da massa seca das sementes (GANTER, 1991; PETKOWICZ et al., 1998^a; AMARAL, 1998).

A denominação galactomanana é dada aos polissacarídeos que apresentam cadeia principal constituída por unidades de D-manose, às quais se encontram ligadas unidades de D-galactose como substituintes (DEY, 1978) (Figura 1). Além da consideração estrutural, a denominação pode ser baseada na composição analítica, onde a quantidade de unidades de D-manose está na faixa de 60-80%, predominando sobre as de D-galactose, na faixa de 40-20% (WHISTLER; SMART, 1953; DEA; MORRISON, 1975). A proporção Man:Gal varia nas diferentes espécies, como apresentado na Tabela 1 (p. 2).

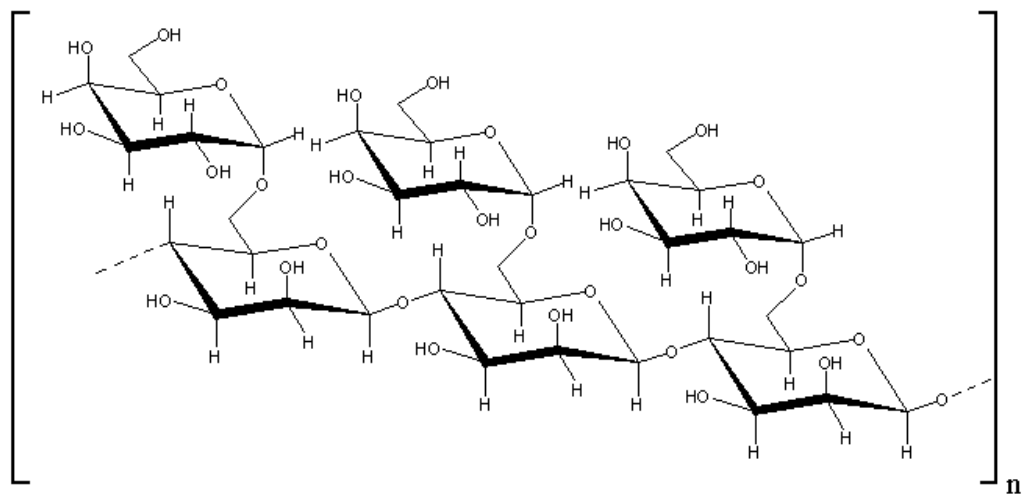


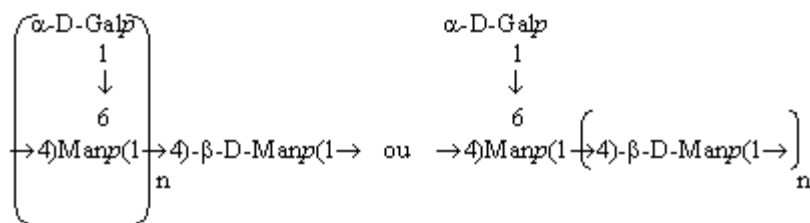
Figura 1: Estrutura parcial de uma galactomana teórica totalmente substituída, com unidades de manose em ligação β -(1→4) e unidades de galactose em ligação α -(1→6).

Tabela 1 – Composição aproximada de algumas galactomananas de sementes de leguminosas (WHISTLER; SMART, 1953):

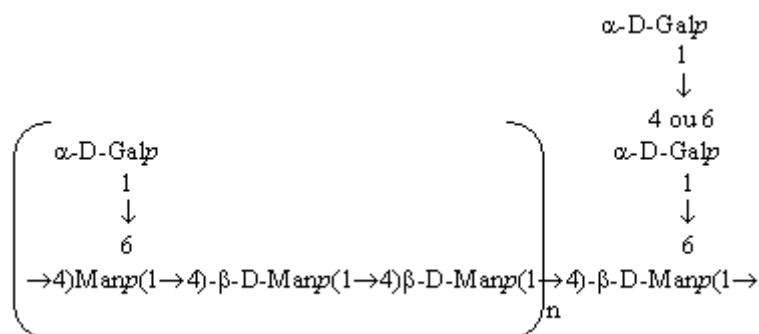
Espécie	Anidro-manose %	Anidro-galactose %
<i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	71	26
<i>Caesalpinia cacalaco</i> (hizache)	69	28
<i>Ceratonia siliqua</i> (carob)	80-86	20-14
<i>Cercidium torreyanum</i> (palo verde)	73	22
<i>Delonix regia</i> (flamboyant)	79	19
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (guar)	64	36
<i>Gleditsia triacanthos</i>	71	26
<i>Gminocladus dioica</i>	71	26
<i>Sophora japonica</i>	81	16
<i>Desmanthus illinoensis</i>	70	26
<i>Indigofera irsuta</i>	72	23
<i>Cassia leptocarpa</i>	65	21
<i>Crotalaria intermedia</i>	64	28

SONI e BOSE (1985), em uma revisão de literatura, exemplificaram as galactomananas de sementes em 6 grupos, sugeridos com base na análise dos produtos de metilação:

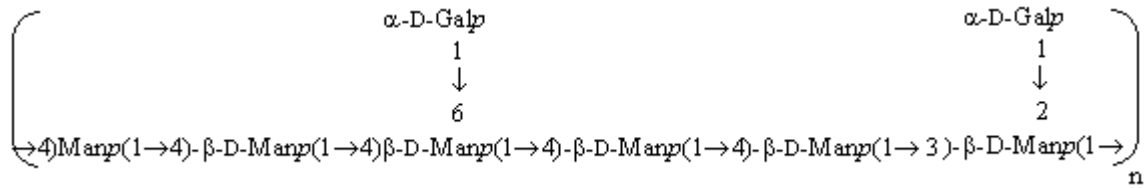
1) Cadeia principal constituída por unidades de β -D-manopirranose unidas por ligação (1 \rightarrow 4) com substituição em O-6 por unidades de α -D-galactopirranose.



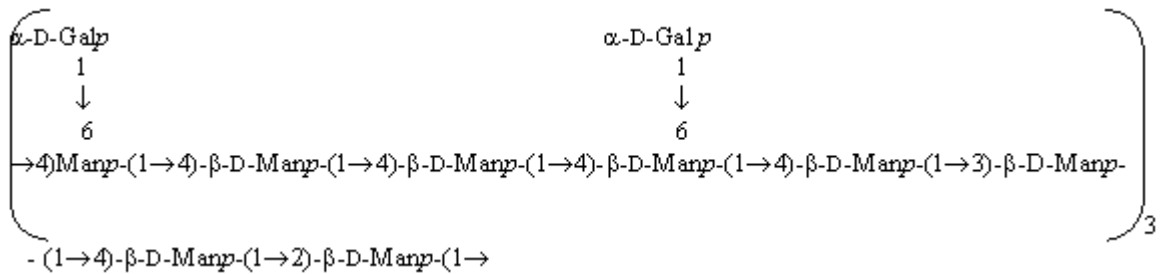
2) Cadeia principal constituída por unidades de β -D-manopirranose unidas por ligação (1 \rightarrow 4) com substituição em O-6 por unidades de α -D-galactopirranose, que por sua vez podem estar substituídas em O-4 ou O-6 por unidades de α -D-galactopirranose.



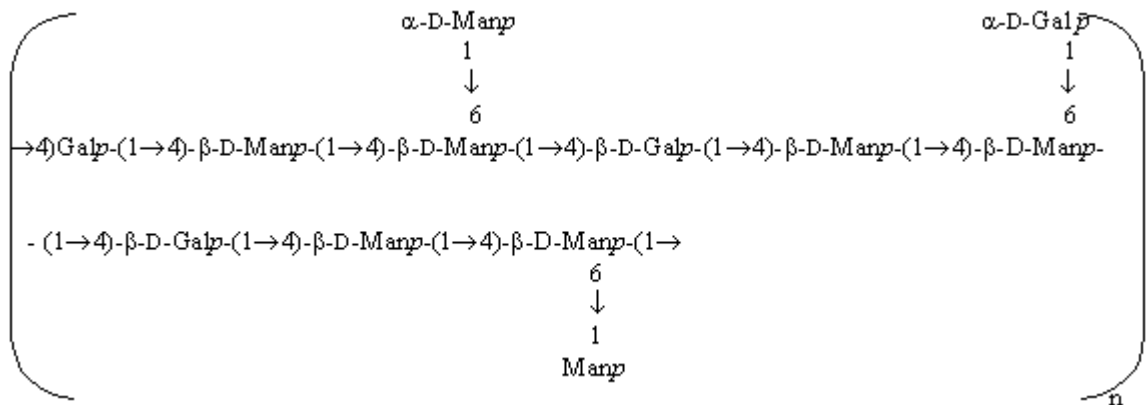
3) Cadeia principal constituída por unidades de β -D-manopiranosose unidas por ligação (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 3) com substituição em O-6 ou O-2 por unidades de α -D-galactopiranosose.



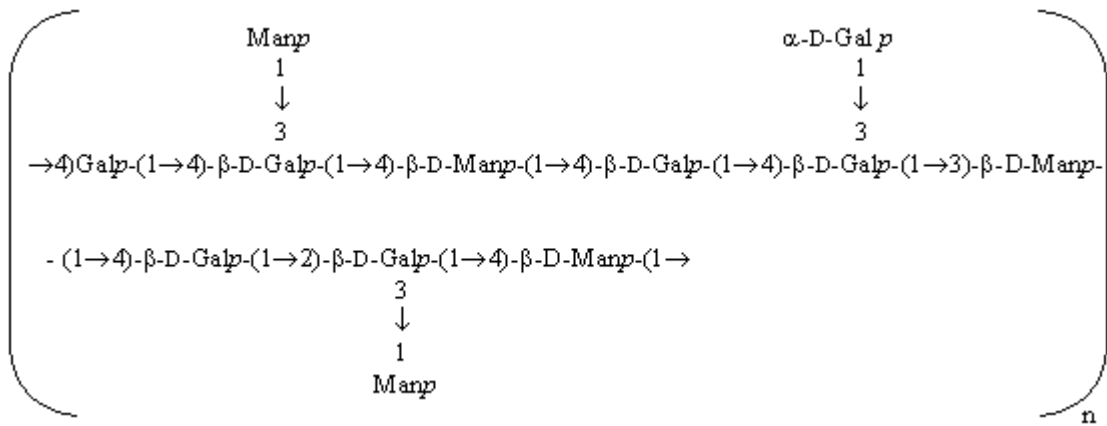
4) Cadeia principal constituída por unidades de β -D-manopiranosose unidas por ligação (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 2), com substituição em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosose.



5) Cadeia principal constituída simultaneamente por unidades de β -D-manopiranosose e β -D-galactopiranosose unidas por ligação (1 \rightarrow 4), com substituição em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosose ou D-manopiranosose.

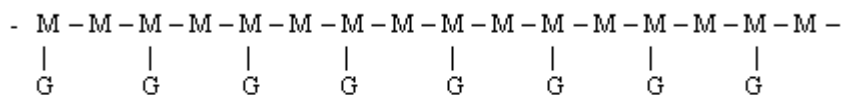


6) Cadeia principal constituída simultaneamente por unidades de β -D-manopirranose e β -D-galactopirranose unidas por ligação (1 \rightarrow 4), com substituição em O-3 por unidades de α -D-galactopirranose ou manopirranose.

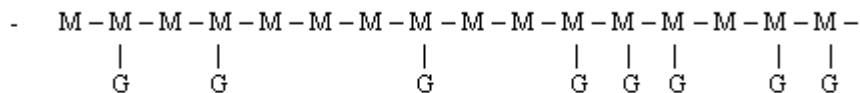


DEA e MORRISON (1975), levantaram a questão de que embora haja um bom entendimento sobre a estrutura de galactomananas, o conhecimento da distribuição dos constituintes ao longo da cadeia principal, ou seja, a estrutura fina, não está esclarecida. Citam três possibilidades de seqüência estrutural para uma galactomanana tendo uma relação D-manose (M):D-galactose (G) de 2,0:1, que seriam:

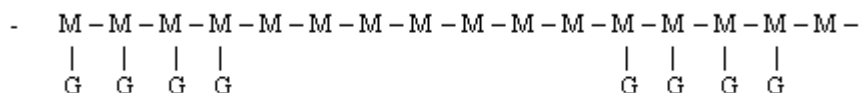
1) Arranjo regular:



2) Arranjo Irregular:



3) Arranjo em blocos:



Avanços na estrutura fina de galactomananas têm sido alcançados por meio da utilização de *endo*-mananases purificadas de *Aspergillus niger* (McCLEARY *et al.*, 1985; DAAS *et al.*, 2000) para a produção de oligossacarídeos através de enzimólise (McCLEARY, 1979^a; McCLEARY, 1979^b), sem a liberação de monômeros de galactose. A conservação dos substituintes α -D-galactopiranosídicos permite o isolamento de oligossacarídeos que reproduzem seqüências reais existentes no polímero original.

DAAS *et al.* (2000), por meio da análise do perfil de oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática de galactomananas como alfarrobo (carob), guar e goma tara, classificaram a distribuição das unidades de α -D-galactopiranoose unidas à cadeia principal como ordenada, ao acaso e em blocos, com base na determinação do grau de substituição (GS) e no grau de “blockiness” (GB). O GB representa o número de unidades de manose não substituída liberado na forma de manose livre, manobiose ou manotriose, após a enzimólise, como uma porcentagem do número total de manose não substituída existentes em 1 g do polímero original. Essa porcentagem variará de acordo com a distribuição das unidades de galactose para galactomananas com a mesma relação Man:Gal. A *endo*-mananase utilizada hidrolisa a ligação β -D-(1 \rightarrow 4) entre as unidades de D-manose em regiões não-substituídas por galactose, de maneira que a quantidade de manose, manobiose e manotriose liberadas, levando-se em consideração a porcentagem de manose não-substituída existente no polímero original, pode refletir a distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia principal. Os autores sugeriram, através da comparação dos GBs obtidos para diferentes amostras de goma de alfarrobo, que L29a e L29c (Tabela 2, p. 7 e Figura 2, p. 6) teriam uma distribuição tendendo para blocos, enquanto L32 ao acaso e L29b e L30 mais ordenada, em comparação com uma curva teórica traçada com base em modelos teóricos de galactomananas com diferentes tipos de estruturas finas. Até o momento, não foram descobertas metodologias para elucidar a seqüência completa (de todo o polímero) de galactomananas que apresentem distribuições em blocos e ao acaso.

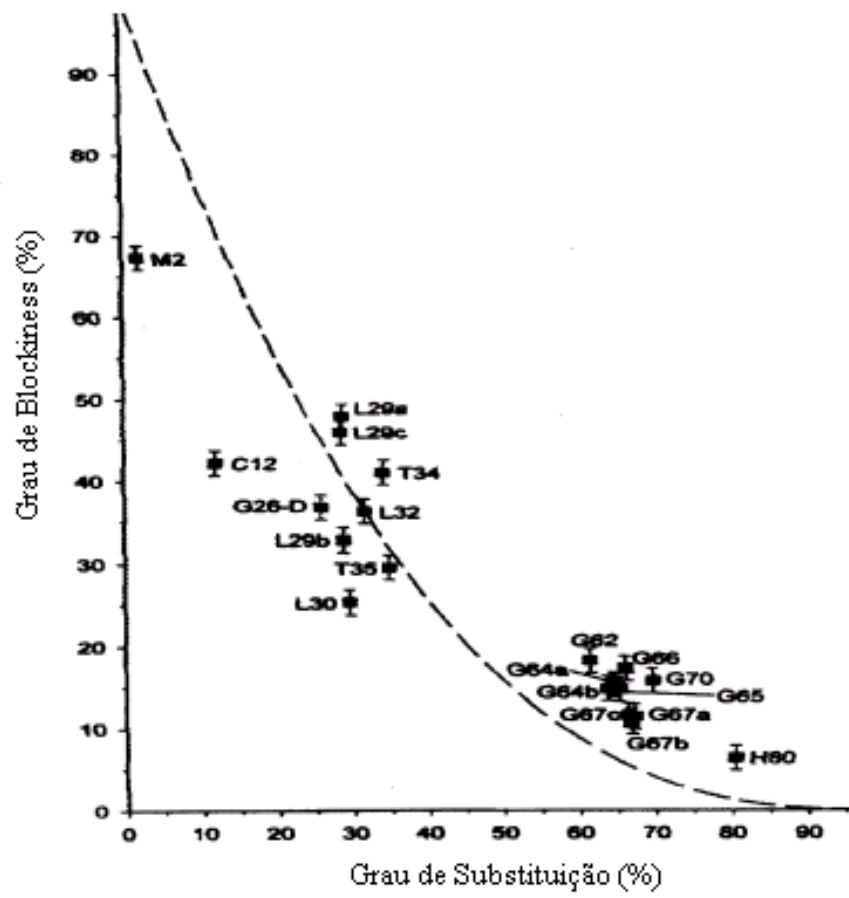


Figura 2 – GB vs. GS de algumas galactomananas (DAAS *et al.*, 2000).

Tabela 2: Conteúdos de manose e galactose, grau de substituição da manose (GS), grau de “blockiness” (GB) e relação de áreas de picos de manose substituída vs. não-substituída de algumas galatomananas estudadas por DAAS *et al.* (2000):

Amostras	Manose (%)	Galactose (%)	Man:Gal	GS (%)	GB (%)	Manose substituída: manose não substituída
C12	69,8	8,3	8,4	11,9	42,2	0,56
G26-D	66,0	17,1	3,9	25,9	36,8	1,06
G62	48,8	30,0	1,6	61,6	18,3	2,50
G64b	51,9	33,5	1,6	64,5	15,3	1,93
G64c	52,5	33,5	1,6	63,7	14,9	2,01
G65	48,4	31,6	1,5	65,3	14,8	2,40
G66	47,1	31,2	1,5	66,2	17,3	2,11
G67a	40,3	27,2	1,5	67,4	11,5	3,02
G67b	50,3	33,7	1,5	66,9	10,8	2,60
G67c	47,7	31,8	1,5	66,6	11,6	2,58
G70	36,3	25,3	1,4	69,6	15,8	3,17
H80	48,3	38,8	1,2	80,5	6,4	3,37
L29a	73,8	21,3	3,5	28,9	48,0	1,40
L29b	71,8	20,8	3,5	28,9	32,9	1,23
L29c	66,4	19,0	3,5	28,7	46,0	1,25
L30	71,1	21,1	3,4	29,7	25,4	1,45
L32	45,0	17,3	3,2	31,6	36,3	1,38
M2	66,3	1,4	48,5	2,1	67,4	0,03
T34	64,9	22,3	2,9	34,3	41,1	2,19
T35	61,3	21,4	2,9	34,9	29,6	2,98

*C, goma de Cassia; G, goma guar; H, galactomanana altamente substituída de *Prosopis juliflora*, L, locust bean (alfarrobo); M, manana; T, goma tara.

1.2 RMN de galactomananas de leguminosas:

Utilizando espectros de RMN-¹³C de galactomananas despolimerizadas (D.P. ~ 20-40) com diferentes razões Man:Gal, GRASDALEN e PAINTER (1980) observaram que os sinais de ressonância de C-4 das unidades de manose eram divididos em função do arranjo da unidade vizinha diretamente ligada. A Figura 3 mostra expansões da região de C-4 de manose para três galactomananas diferentes; em vista do pico III ser mais intenso na galactomanana de goma de alfarrobo, que é a menos substituída, esse sinal corresponderia ao C-4 de unidades de manoses que estariam ligadas a outra unidade de manose não substituída; o pico I (em campo mais baixo), por apresentar um aumento gradativo de intensidade à medida que a estrutura se apresenta mais substituída, corresponderia ao C-4 de manose substituída que estaria ligada a outra unidade de manose substituída; o pico II (intermediário), representaria a sobreposição de sinais originados por díades onde uma das unidades seria substituída por galactose, podendo também ser originado por tríades, como sugerem MANZI, CERESO e SHOOLERY (1986).

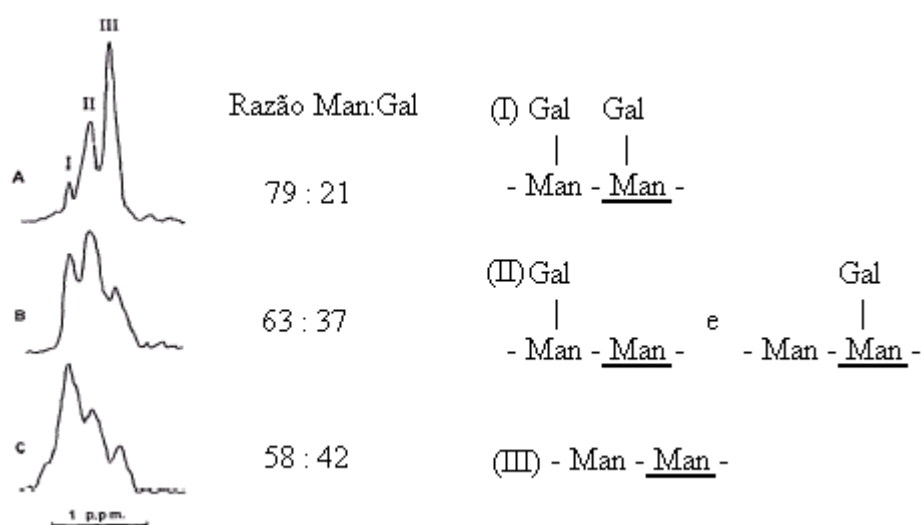


Figura 3: Região espectral de RMN-¹³C em solução, a 25 MHz, de C-4 de unidades de D-manose em A, goma de alfarrobo, B, guar e C, galactomanana de sementes de clover (GRASDALEN; PAINTER, 1980).

Os autores inferem que as frequências obtidas para as diferentes díades excluem a possibilidade de estruturas altamente ordenadas, díades de manose substituída ligada a manose não substituída de modo alternado, ou ainda, blocos contínuos de manose substituída

alternando com blocos contínuos de manose não substituída, não excluindo a possibilidade de existência de arranjos ordenados mais complexos que os acima citados.

MANZI, CEREZO e SHOOLERY (1986) relataram a subdivisão do sinal de C-6 de manose substituída nos espectros de RMN-¹³C de galactomananas de sementes de *Gleditsia triacanthos* despolimerizadas (DP ~ 60-80 a 28-38) por hidrólise ácida, relacionando os 3 sinais observados nessa região ao ambiente criado por 3 diferentes tríades (2 unidades de manoses substituídas ou não, adjacentes a uma unidade de manose central) (Figura 4).

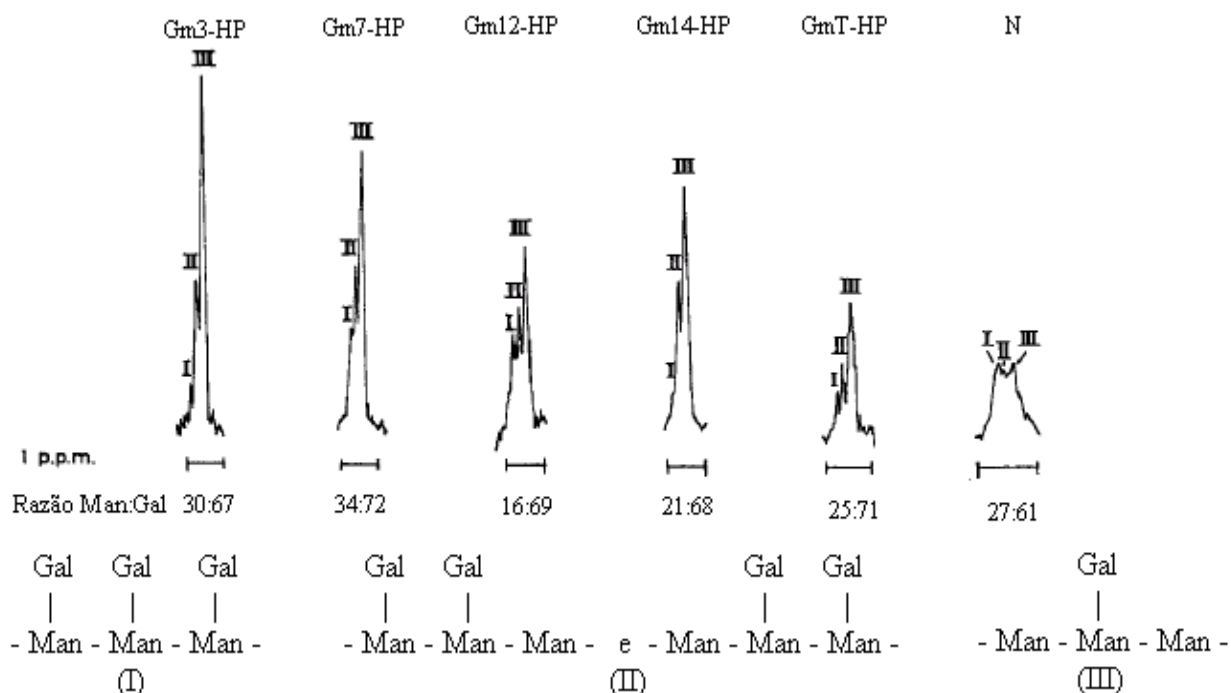


Figura 4: Região espectral de RMN-¹³C (75 MHz) de C-6 de unidades de D-manose substituída em galactomananas hidrolisadas por ácido fosfórico (MANZI; CEREZO; SHOOLERY, 1986).

DAVIS *et al.* (1995) assinalaram completamente os sinais de ¹H e de ¹³C do heptassacarídeo digalactosilmanopentaose (Figura 5, p. 10, Tabelas 3 e 4, p. 10) obtido por enzimólise da goma carob com β -D-mananase, utilizando técnicas de RMN uni e bidimensionais (TOCSY, ROESY, HMQC e HMBC). A goma carob é uma galactomanana com razão Man/Gal de 5,5 e é constituída de uma cadeia principal com unidades de β -D-(1 \rightarrow 4)-manopiranosose substituídos ou não por unidades de α -D-(1 \rightarrow 6)-galactopiranosose.

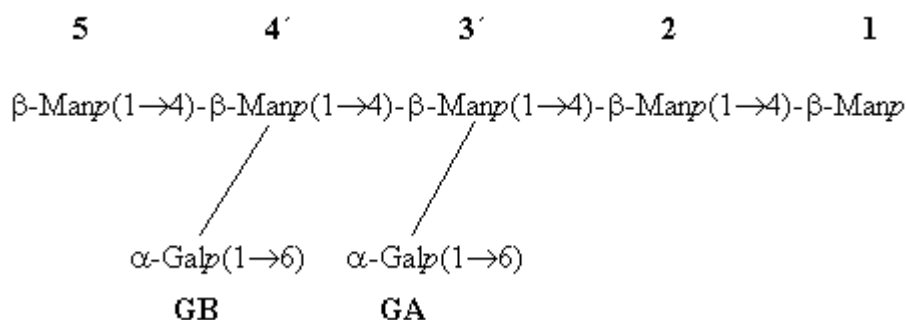


Figura 5: Estrutura do heptassacarídeo digalactosilmanopentaose determinada por RMN (DAVIS *et al.*, 1995).

Tabela 3: Deslocamentos químicos de ^1H do oligossacarídeo Gal_2Man_5 (DAVIS *et al.*, 1995):

Átomo	Unidade							
	1_α	1_β	2	3'	4'	5	$G_{A,B}$	
1	5,18	4,91	4,76 (2_α) 4,75 (2_β)	4,77	4,77	4,73	5,03 (G_A) 5,03 (G_B)	
2	4,00	4,00	4,13 (2_α) 4,12 (2_β)	4,14	4,15	4,08	3,84	
3	3,99	3,80	3,80	3,82	3,81	3,64	3,94	
4	3,90	3,86	3,85	3,90	3,88	3,60	4,01	
5	3,90	3,50	3,57	3,77	3,76	3,43	3,90	
6	3,84	3,90-3,80	3,92	3,98	3,97	3,94	3,77	
6'	3,76	3,75	3,80-3,75	3,80	3,81	3,75		

Tabela 4: Deslocamentos químicos de ^{13}C do oligossacarídeo Gal_2Man_5 (DAVIS *et al.*, 1995):

Átomo	Unidade								
	1_α	1_β	2	3'	4'	5	$G_{A,B}$		
1	95,15	95,01	101,46(2_α) 101,52(2_β)	101,55	101,31	101,38	100,11(G_A) 100,16(G_B)		
2	71,67	72,03	71,29 (2_α) 71,27 (2_β)	71,18	71,24	71,82	69,76	69,77	
3	70,28	73,00	72,85 (2_α) 72,83 (2_β)	72,68	72,74	74,19	70,74		
4	78,18	77,86	78,17	78,33	78,08	68,05	70,63	70,61	
5	72,31	76,12	76,28	74,64	74,72	77,79	72,57		
6	61,93	61,93	61,93	67,83	67,93	62,34	62,52	62,50	

RAMESH *et al.* (2001) identificaram os sinais de RMN- ^{13}C e RMN- ^1H de uma galactomanana totalmente substituída baseando-se em técnicas de RMN bidimensionais (COSY, TOCSY, HSQC e HMBC). A galactomanana de *Trigonella foenum-graecum* L., por apresentar razão Man/Gal de 1,0 e, portanto, possuir estrutura ordenada, pôde ser analisada exclusivamente por RMN, sem utilização de fragmentação química. Esse polissacarídeo apresentou M_w : $1,42 \times 10^6$, determinado por HPSEC-RALLS (BRUMMER; CUI; WANG, 2003). Os autores determinaram os sinais de H-1 Gal (5,02 ppm) e H-1 Man (4,75 ppm) com base em valores relatados em literatura, assim como os sinais de C-6 Gal (62,80 ppm) e C-6 Man substituída (68,00 ppm). Através do espectro de COSY (Figura 6, p. 12) foram assinalados todos os hidrogênios de galactose. O H-6 Man foi assinalado pelo HSQC (Figura 7, p. 13) e, é provável que os autores tenham assinalado os H-2 e H-3 Man pelo espectro de TOCSY, analisando as correlações observadas na linha do hidrogênio anomérico de manose. Permaneceriam não identificados os sinais de ^{13}C a 75,00 e 78,30 ppm. O espectro de HMBC (Figura 8, p. 14) mostra uma correlação entre o H-2 Man (4,13 ppm) e o sinal de ^{13}C em 78,3 ppm, que, a uma distância de no máximo 3 ligações, poderia corresponder apenas ao C-4 de Man. O espectro de HMBC também mostra os acoplamentos H-1 Gal/C-6 Man e H-1 Man/C-4 Man, indicando unidades de manose ligadas (1→4) e substituídas em O-6 por galactose unida por ligação (1→6). O assinalamento completo é mostrado na Tabela 5 (p. 15).

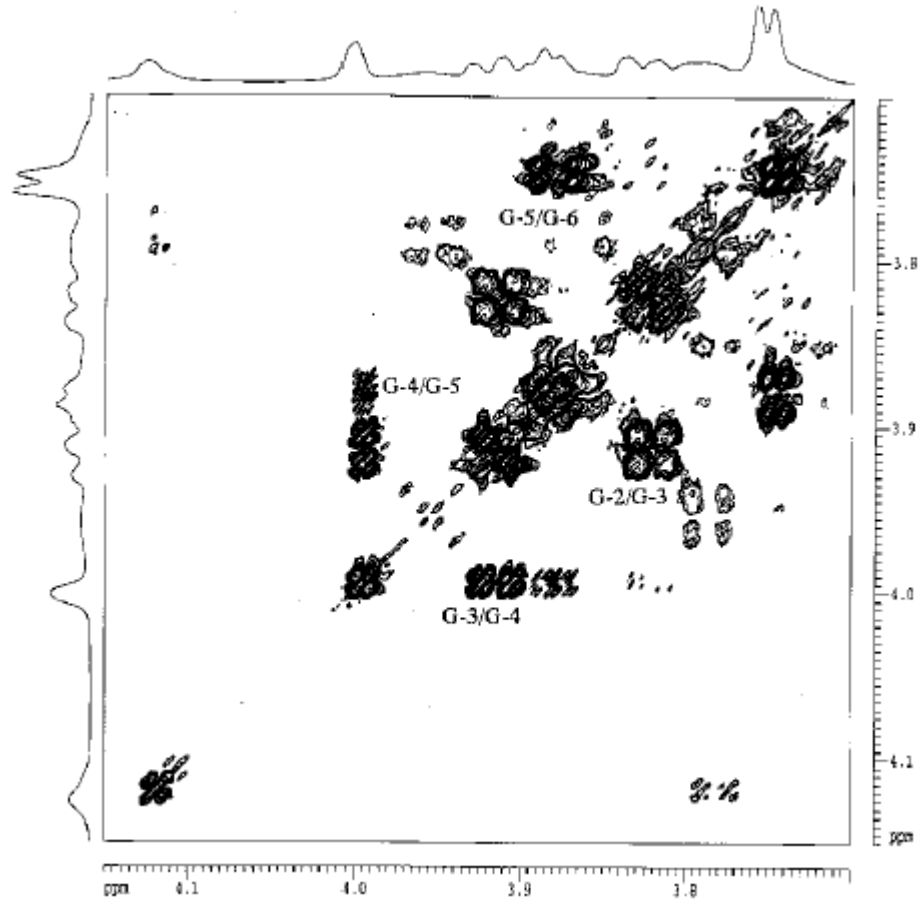


Figura 6: Expansão do espectro de ^1H - ^1H COSY da galactomanana de sementes de *T. foenum-graecum* L (RAMESH *et al.*, 2001).

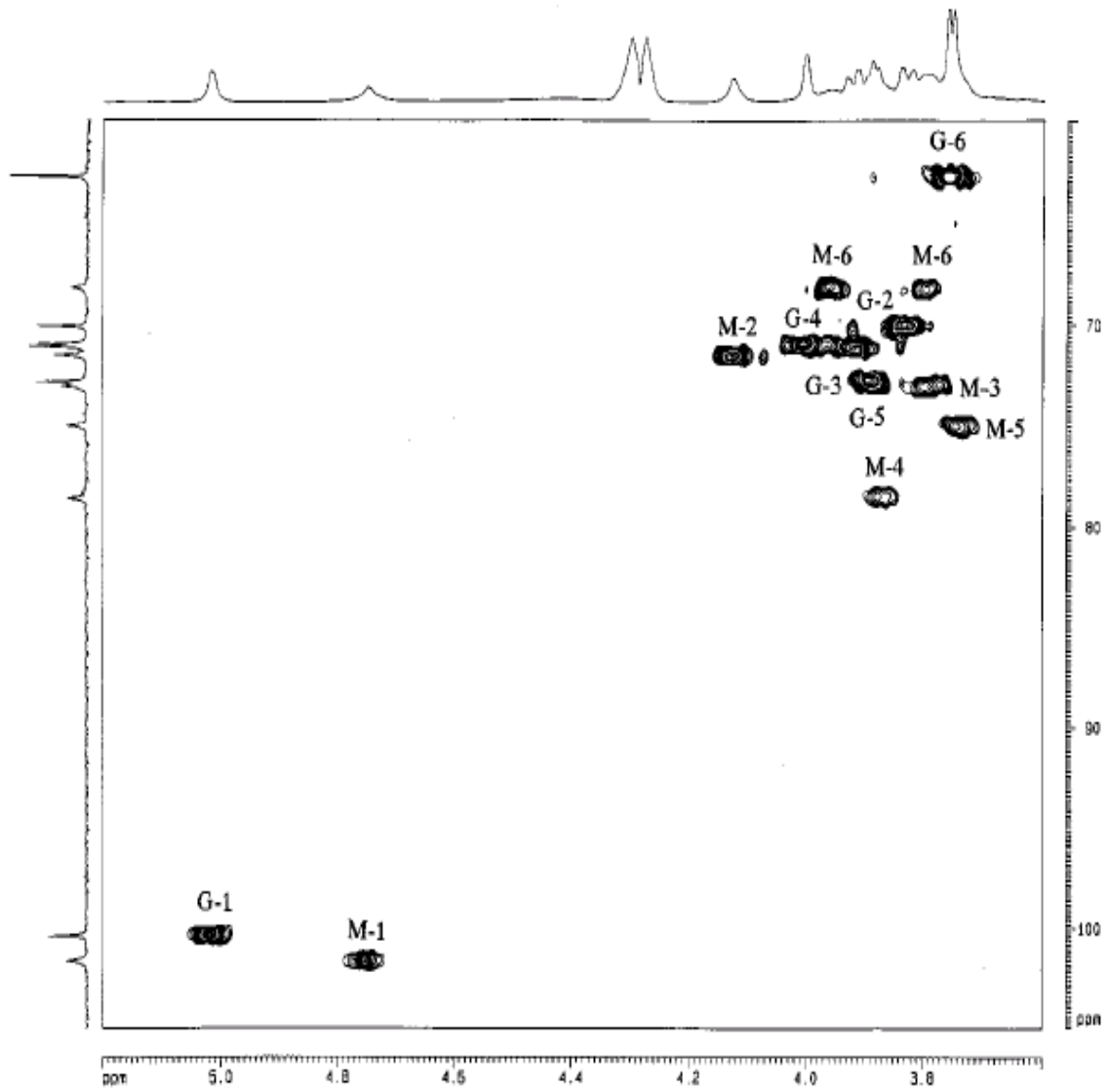


Figura 7: Espectro de ^1H - ^{13}C HSQC da galactomanana de sementes de *T. foenum-graecum* L (RAMESH *et al.*, 2001).

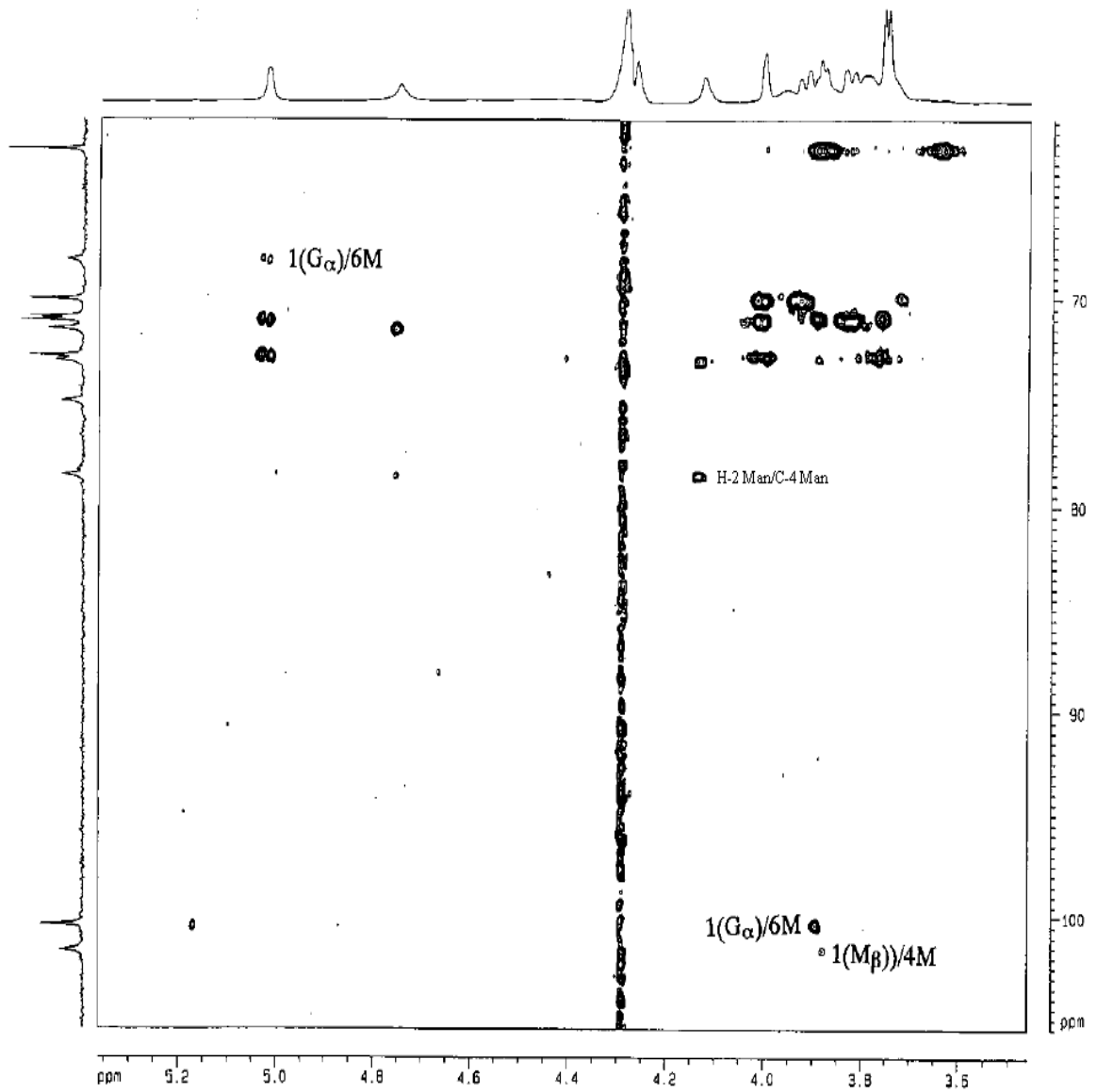


Figura 8: Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da galactomanana de sementes de *T. foenum-graecum* L (RAMESH *et al.*, 2001).

Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN- ^1H e ^{13}C (ppm) da galactomanana de sementes de *T. foenum-graecum* L (RAMESH *et al.*, 2001):

Posição	^1H	^{13}C
Galactose		
1	5,02	100,20
2	3,83	70,00
3	3,92	70,90
4	4,00	70,00
5	3,90	72,65
6	3,76	62,80
Manose		
1	4,75	101,80
2	4,13	71,50
3	3,79	73,00
4	3,87	78,30
5	3,74	75,00
6	3,96	68,00
	3,80	

1.3 *Mimosa scabrella*:

A *Mimosa scabrella* Bentham é conhecida vulgarmente como bracatinga, abracatinga, bracatinho, paracaatinga, bracatinga-branca, bracatinga-vermelha, bracatinga-argentina, maracatinga, anizeiro e mandengo (EMBRAPA, 1988). Apresenta os seguintes sinônimos botânicos: *Mimosa scabrella* G. Bentham, *Mimosa bracaatinga* Hoehne, *Mimosa sordida* Bentham, *Mimosa bracaatinga* Hoehne var. *aspericarpa* Hoehne, *Mimosa scabrella* Bentham var. *aspericarpa* (Hoehne) Burkart (EMBRAPA, 1988).

Segundo revisão realizada por FABROWSKI (1998), a bracatinga apresenta a seguinte classificação sistemática:

Segundo Engler	Segundo Cronquist
<u>Divisão:</u> Angiospermae	Magnoliophyta
<u>Classe:</u> Dicotyledoneae	Magnoliopsida
<u>Subclasse:</u> Archichlamydeae	Rosidae
<u>Ordem:</u> Rosales	Fabales
<u>Família:</u> Leguminosae	Mimosaceae
<u>Sub-família:</u> Mimosoideae	-----
<u>Gênero:</u> <i>Mimosa</i>	<i>Mimosa</i>
<u>Espécie:</u> <i>M. scabrella</i> Bentham	<i>M. scabrella</i> Bentham

Suas folhas são ásperas ao tato devido aos pêlos curtos e estrelados, de onde provém a designação “scabrella”. A designação “aspericarpa” é devido ao fato de que o fruto apresenta superfície áspera com rugosidades (EMBRAPA, 1988).

A árvore cresce de 3,5 até mais de 15-20 metros de altura, com 40-50 cm de diâmetro. As folhas apresentam-se em ramos vigorosos muito grandes (até 14 pares de pinas), pinas opostas de 2-7 cm de comprimento. Apresenta 15-31 pares de folíolos por pina, oblongo-elípticos ou lineares, de 2,5-8 mm por 0,6-2,8 mm de comprimento e largura, onde estão densamente presentes pêlos estrelados em ambas as faces. Os capítulos florais esféricos ou elípticos de 6-7 mm de diâmetro, são pedunculados (0,7 a 2 cm de comprimento), 1-3 por nó, axilares ou laterais. O lomento é oblongo-linear, achatado e as sementes são ovais, achatadas, duras, marrom-escuras, de 5-6 mm, com cotilédones esverdeados (BURKART, 1979).

Na região Sul, a maturação dos frutos ocorre no período de novembro a março. O rendimento de sementes colhidas por árvore varia de 300 g a 2 kg, apresentando em média, 58 mil a 80 mil sementes/kg (EMBRAPA, 1988).

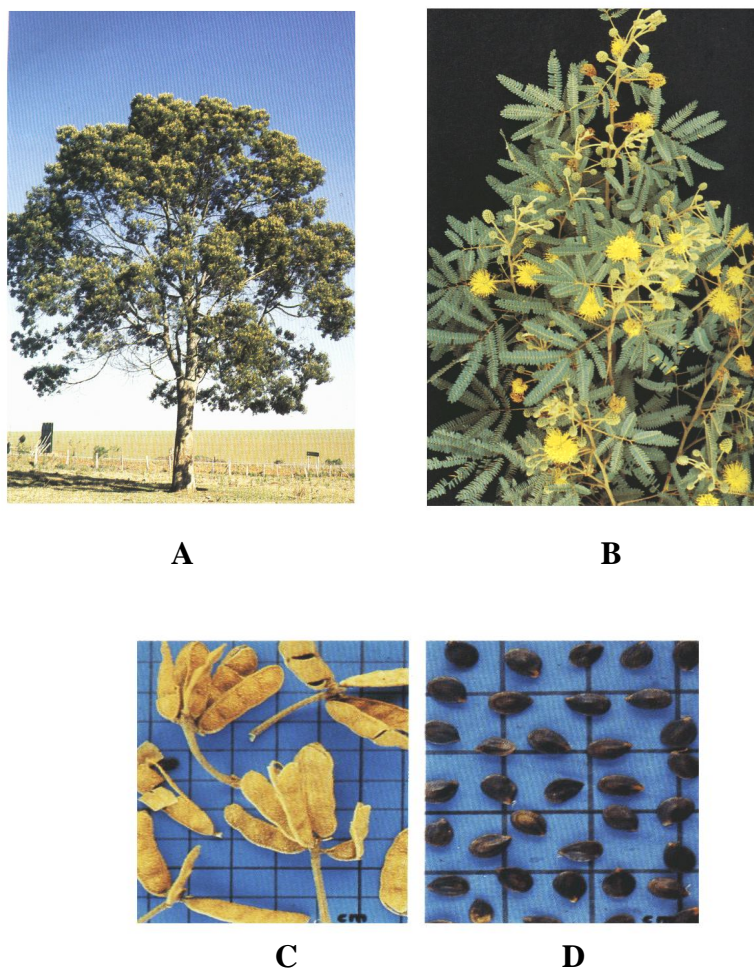


Figura 9: Árvore (A), flores (B), frutos (C) e sementes (D) de *M. scabrella* (LORENZI, 1998).

Na UFPR, GANTER (1988) iniciou os estudos de caracterização química estrutural da galactomanana extraída de sementes de *Mimosa scabrella*. Obteve, a partir de extração aquosa, uma fração polissacarídica predominante com relação Man:Gal de 1,1:1. Estudos de cromatografia dessa fração sugeriram uma massa molar entre $1,5$ e 2×10^6 g.mol⁻¹, relativa a padrões de dextrana, não sendo descartada a possibilidade de agregação molecular. A análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados e de RMN-¹³C indicaram uma galactomanana constituída de uma cadeia principal de β -D-manose ligada (1→4), com substituições de α -D-galactose unidas por ligações (1→6).

GANTER (1991) realizou estudos de análise estrutural dos oligossacarídeos naturais presentes em sementes de *M. scabrella*. Os oligossacarídeos foram fracionados por GPC, purificados por HPLC e analisados estruturalmente por métodos cromatográficos e espectroscópicos, isolando as seguintes frações:

- 1) Monossacarídeos e álcoois livres como sorbitol, galactitol, arabinitol, manitol, eritritol, glicerol e ciclitóis como o *mio*-inositol;
- 2) Ciclitóis como o pinitol além da sacarose (representam 50% dos componentes de oligossacarídeos presentes nas sementes de *M. scabrella*);
- 3) Rafinose;
- 4) Estaquiase, trigalactosil pinitol (ineditadamente isolado e caracterizado);
- 5) Verbascose;
- 6) Ajugose.

O estudo do processamento das sementes de *M. scabrella* em uma escala piloto foi realizado por GANTER *et al.* (1997), partindo de 500 g de sementes moídas em um tanque reator de aço inox (capacidade 30 L), com temperatura e agitação controladas, obtendo um rendimento de extração de 20% de galactomanana com características similares à extraída em escala laboratorial (Man:Gal 1,1:1 e $[\eta] = 740 \text{ mL.g}^{-1}$). Os autores ressaltaram que, seguindo-se o processo utilizado, a região metropolitana de Curitiba poderia produzir 3000 t de galactomanana ao ano.

GANTER e REICHER (1999) estudaram galactomananas de 4 espécies de *Mimosaceae* spp. (*M. scabrella*, *M. flocculosa*, *M. taimbensis* e *M. bimucronata*) com relação Man:Gal ~1:1, visando possíveis aplicações em indústrias de cosméticos e de alimentos em substituição a galactomananas comercializadas como o guar. Foram obtidos espectros de RMN-¹³C muito similares entre si. A Figura 10 (p. 19) corresponde à região de sinais de C-4 de manose, onde para as galactomananas de espécies de *Mimosaceae* estudadas, o sinal em $\delta 79,1$ (díade I), corresponde a duas unidades de D-manopiranosose substituídas; o sinal da díade II, quando somente uma das unidades de D-manopiranosose é substituída e o sinal em III corresponde a 2 unidades de D-manopiranosose adjacentes não substituídas.

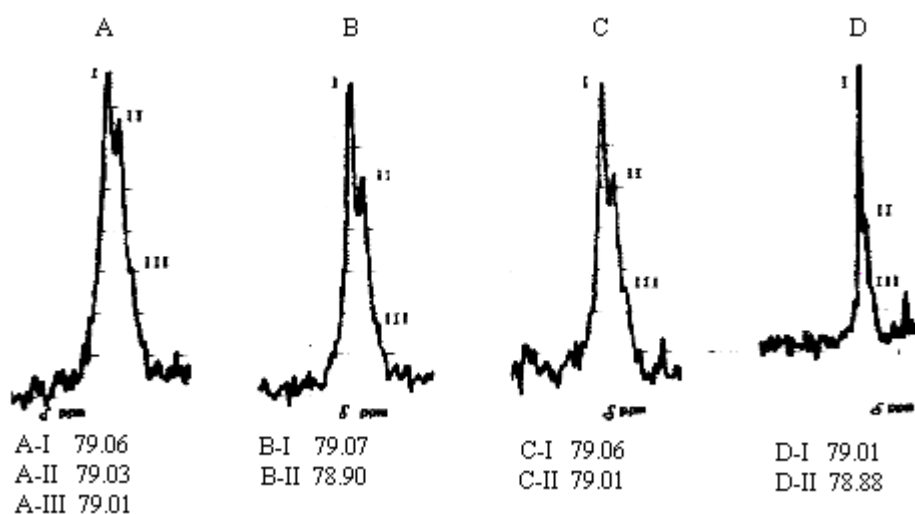


Figura 10 – Região de sinais de C-4 de manose em espectro de RMN-¹³C para galactomananas de sementes de *Mimosaceae* spp. (A) *M. scabrella*, (B) *M. bimucronata*, (C) *M. flocculosa*, (D), *M. taimbensis*. I, II e III referem-se a diferentes díades de manose (GANTER; REICHER, 1999).

GANTER *et al.* (1995) obtiveram oligossacarídeos (DP 2 a 6) de galactomananas de *M. scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman*, *Schizolobium parahybum*, *Schizolobium amazonicum*, por hidrólise ácida parcial em H₂SO₄ 25 mM a 100°C (5 h). As frações obtidas após cromatografia de gel permeação e cromatografia líquida de alta pressão foram caracterizadas por espectroscopia de RMN-¹³C e RMN-¹H. Os autores relacionaram a diminuição do rendimento de epimelibiose (G-M) ao grau de substituição das galactomananas, onde *M. scabrella*, altamente substituída (Man:Gal 1,1:1), apresentou maior rendimento (61,5%) que *Stryphnodendron barbatiman* (Man:Gal 1,5:1, 30,6%), *Schizolobium parahybum* e *Schizolobium amazonicum* (Man:Gal 3,0:1, 17 e 18% respectivamente). A hidrólise ácida parcial em H₂SO₄ produziu galactose e manose livres, além de produtos de degradação paralelamente aos oligossacarídeos (os produtos desejados foram obtidos com rendimento superior a 80%).

Relacionado à atividade biológica da galactomanana de *Mimosa scabrella*, GERMANO (1996) realizou estudos envolvendo derivatização por sulfatação para a obtenção de heparinóides com atividade anticoagulante.

1.4 *Leucaena leucocephala*:

As árvores de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit são popularmente conhecidas no Brasil como leucena. Apresenta o sinônimo botânico *Leucaena glauca* (Willd) Benth. (LEAL, 1993).

Segundo revisão realizada por LIMA (1982), há duas classificações sistemáticas possíveis para essa espécie:

Segundo Engler	Segundo Cronquist
<u>Divisão</u> : Angiospermae	Magnoliophyta
<u>Classe</u> : Dicotyledoneae	Magnoliopsida
<u>Sub-classe</u> : Archichlamydeae	Rosidae
<u>Ordem</u> : Rosales	Fabales
<u>Família</u> : Leguminosae	Mimosaceae
<u>Sub-família</u> : Mimosoideae	-----
<u>Gênero</u> : <i>Leucaena</i>	<i>Leucaena</i>
<u>Espécie</u> : <i>L. leucocephala</i> (Lam) de Wit	<i>L. leucocephala</i> (Lam) de Wit

A leucena é uma árvore perene de porte arbustivo a arbóreo, originária da América Central. Apresenta folhas bipinadas de 15 a 25 cm de comprimento, com 4-10 pares de pinas, cada qual com 5-20 pares de folíolos. Flores brancas, agrupadas em capítulo globular. Seus frutos são finos e achatados (12-18 cm de comprimento), contendo 15-25 sementes elípticas de coloração marrom-brilhante (LIMA, 1982; SÁ, 1997). Aproximadamente 15000-16000 unidades são fornecidas em 1 kg de sementes (SÁ, 1997). Não foram encontrados dados de produção de sementes de *L. leucocephala* descritos em literatura.

A leucena é cultivada como planta forrageira e apresenta valor nutritivo proteico comparável ao da alfafa, tendo boa aceitabilidade por ruminantes, contribuindo no ganho de massa e na produção de leite (SÁ, 1997). Na América Central, Indonésia e Tailândia, suas folhas e sementes são utilizadas na alimentação humana (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1977).

Um fator anti-nutricional importante encontrado em sementes dessa espécie é o aminoácido não-proteico mimosina (um análogo da tirosina, β -(3-hidroxi-4-piridon-1-il)-L-alanina), responsável por inibição do apetite, alopecia, retardo de crescimento, decréscimo de fertilidade e em alguns casos, morte em não-ruminantes. Quando a forragem é consumida em até 3% da massa do animal, não apresenta efeitos tóxicos. A mimosina provavelmente exerce

seus efeitos tóxicos bloqueando as vias metabólicas de aminoácidos aromáticos e do triptofano, por quelar metais, por antagonizar a ação da vitamina B6, por inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1977; LALITHA *et al.*, 1993).

McCLEARY (1979^b) produziu oligossacarídeos de *L. leucocephala*, por enzimólise, utilizando uma β -D-mananase comercial, verificando que, mesmo sendo uma galactomanana bastante substituída (Man:Gal ~1,6:1), era hidrolisada a uma velocidade maior que galactomananas de outras espécies com relação Man:Gal semelhante (em geral, a porcentagem de hidrólise pela β -D-mananase aumenta com a diminuição do conteúdo de substituição por galactose. O menor oligossacarídeo presente no hidrolisado foi GalMan₂ (que correspondeu a 25% dos carboidratos totais do hidrolisado), sugerindo que grandes seqüências seriam constituídas pela unidade repetitiva [(Gal→)Man→Man]_n. O outro oligossacarídeo identificado foi GalMan₄, sendo que as outras frações constituíram fração precipitável com etanol, e fração retida no ponto de aplicação em TLC.

Uma vez que a enzima não produziu hidrólise mais efetiva (a fração precipitável por etanol constituiu a maior porcentagem), é possível que existam outras seqüências dentro do polímero original com distribuição de grupos galactosil diferentes da unidade repetitiva [(Gal→)Man→Man]_n sugerida, e, portanto, seria interessante a utilização de uma metodologia diferente da hidrólise parcial enzimática, com purificação, quantificação e caracterização dos oligossacarídeos obtidos.

BUCKERIDGE *et al.* (1987) realizaram estudos de determinação da relação Man:Gal (por hidrólise ácida química e cromatografia líquido-gasosa dos acetatos de alditóis) em sementes de 5 populações de *L. leucocephala* diferindo na tolerância a alumínio, tamanho, grau de maturação ou local de origem, verificando relação ~2:1.

BUCKERIDGE *et al.* (1995), baseados em estudos de determinação do rendimento e relação Man:Gal de galactomananas extraídas de sementes de leguminosas, incluindo *Leucaena* spp., sugerem que, durante a evolução em que as subfamílias *Mimosoideae* e *Faboideae* derivaram da *Caesalpinioideae*, houve um decréscimo do conteúdo de galactomananas nas sementes e um aumento da proporção de galactose (galactomananas mais substituídas). Assim, esse polissacarídeo poderia atuar como um fator de adaptação climática dessas diferentes espécies.

**A****B****C****D**

Figura 11: Árvores (A), flores (B), frutos (C) e sementes (D) de *L. leucocephala* (SÁ, 1997).

1.5 *Cassia fastuosa*:

Posição sistemática da *Cassia fastuosa* Willd (RICARDI, 1992; JOLY, 1998):

Segundo Engler	Segundo Cronquist
<u>Divisão</u> : Angiospermae	Magnoliophyta
<u>Classe</u> : Dicotyledoneae	Magnoliopsida
<u>Sub-classe</u> : Archichlamydeae	Rosidae
<u>Ordem</u> : Rosales	Fabales
<u>Família</u> : Leguminosae	Caesalpinaceae
<u>Sub-família</u> : Caesalpinioideae	-----
<u>Gênero</u> : <i>Cassia</i>	<i>Cassia</i>
<u>Espécie</u> : <i>C. fastuosa</i> Willd.	<i>C. fastuosa</i> Willd.

Essa leguminosa é largamente utilizada na ornamentação de parques, jardins e logradouros públicos, devido ao seu porte e inflorescências amarelas densas. Também fornece madeira na Amazônia. A árvore atinge uma altura de 6-8 m, as folhas apresentam até 30 cm de comprimento, com 10-12 pares de folíolos, limbo de 4-4,5 cm de comprimento por 1,5-2 cm de largura. Inflorescências em ráculos terminais piramidiformes, flores longo-pediculadas amarelas, com até 5 cm de diâmetro. Apresenta fruto quadrangular, de até 50 cm de comprimento (CONTIN, 1974). Cada legume apresenta de 40 a 50 sementes com massa total de sementes variando entre 8 – 10 g por legume (TAVARES, 1994). Não foram encontrados dados de produção de sementes de *C. fastuosa* descritos em literatura.

TAVARES (1994) isolou e caracterizou a galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa*, obtendo um polissacarídeo com 27% de rendimento e relação Man:Gal ~ 4:1. A massa molar ponderal média (Mw) obtida através de difração de luz foi de $562 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$. A análise dos acetatos de alditóis parcialmente metilados e RMN-¹³C indicaram uma cadeia principal constituída por unidades de β-D-manopiranosose unidas por ligações (1→4), das quais 20% estariam substituídas em O-6 por unidades de α-D-galactopiranosose. TAVARES (1994) também obteve derivados sinteticamente sulfatados dessa galactomanana.

GERMANO (1996) sintetizou derivados sulfatados das galactomananas de sementes de *C. fastuosa* (DS 0,87) e de *M. scabrella* (DS 1,13), e observou que apresentavam propriedade anticoagulante.

**A****B****C**

Figura 12: Árvore (A), folhas e flores (B), fruto e sementes (C) de *C. fastuosa* (KRAMBECK, 1984).

PETKOWICZ *et al.* (1998^b) realizaram um trabalho comparativo entre oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial de galactomananas de sementes de três espécies diferentes (*Schizolobium parahybae*, *Schizolobium amazonicum* e *Cassia fastuosa*) com a mesma relação Man:Gal (3,0:1). Os autores discutem que há menor proporção de homo-oligossacarídeos de manose na espécie *Cassia fastuosa*, quando comparado às espécies de *Schizolobium*, em concordância com os sinais de RMN-¹³C de C-4 das unidades de D-Manp, onde o sinal correspondente a duas D-Manp adjacentes não substituídas é menos intenso. Haveria indicativos de que as regiões não-substituídas ao longo da cadeia principal seriam menos abundantes na galactomanana de *Cassia fastuosa* e que, portanto, a estrutura fina ou distribuição dos grupos galactosil ao longo da cadeia de manose seria diferente quando comparada a *S. amazonicum* e *S. parahybae*.

CHAUBEY e KAPOOR (2001) estudaram a galactomanana de sementes de *Cassia angustifolia* Vahl, também pertencente à família Caesalpiniaceae, determinando uma razão Man: Gal de 2,9:1 e M_w : $96,6 \times 10^3$. A cadeia principal dessa galactomanana seria constituída por unidades de D-Manp unidas por ligações do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ com substituições por unidades de D-Galp em ligações do tipo $\alpha-(1 \rightarrow 6)$. Outra galactomanana foi extraída de sementes de *Cassia grandis* Linn. f. (JOSHI; KAPOOR, 2003) com razão Man:Gal de 3,2:1, M_w : $80,2 \times 10^3$ e com os mesmos tipos de ligações entre as unidades de manose e galactose.

1.6 Oxidação seletiva do grupo hidroximetil de polissacarídeos:

Nos polissacarídeos, as propriedades químicas, entre elas a estrutura, e físicas, entre elas a capacidade de adsorção, podem ser alteradas através de modificações químicas, conferindo-lhes novas aplicações. Grupos carboxil podem ser gerados em polissacarídeos neutros contendo grupos de CH_2OH , através de oxidação, originando poliuronatos (WHISTLER, 1993). Dentro da biotecnologia de alimentos, por exemplo, amidos de milho oxidados podem apresentar gelatinização em temperaturas inferiores ao do polímero não modificado, com aumento da solubilidade e da estabilidade (WURZBURG, 1986).

De NOOY *et al.* (1994, 1995, 1996) empregaram a metodologia utilizada por SEMMELHACK *et al.* (1983) para oxidar, em polissacarídeos, álcoois primários, obtendo alto rendimento, seletividade e baixa taxa de despolimerização. Essa metodologia emprega o reagente 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) em concentrações catalíticas. Estudos de aplicação do TEMPO na oxidação de outros compostos orgânicos já haviam sido descritos (GANEM, 1975; SEMMELHACK *et al.*, 1983).

O reagente TEMPO (Figura 13) é um radical estável, que é oxidado pelo íon hipobromito, gerando o íon nitrosônio, um forte oxidante que mostra seletividade para grupamentos hidroxílicos primários. O hipobromito consumido é regenerado através de oxidação do íon hipoclorito presente no meio de reação (de NOOY *et al.*, 1994).

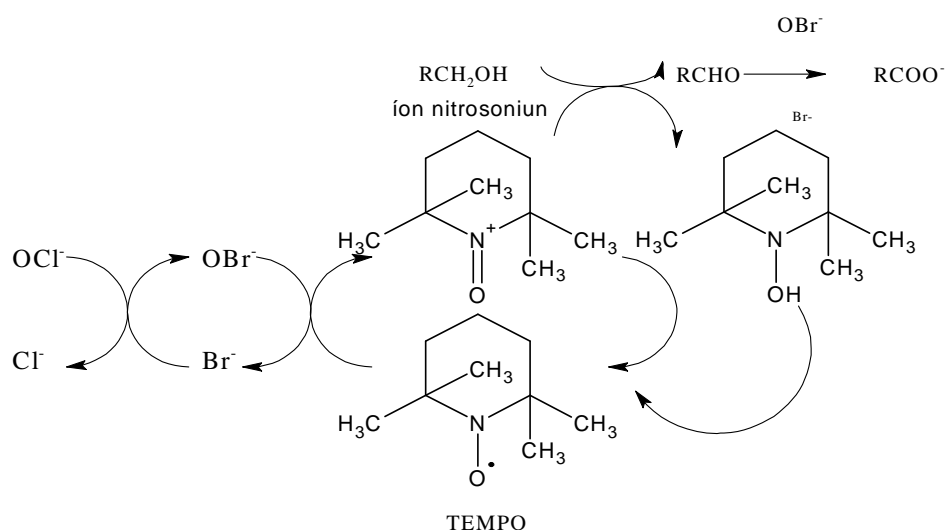


Figura 13: Etapas envolvidas na oxidação de álcool primário na presença de TEMPO, hipobromito e hipoclorito de sódio (de NOOY *et al.*, 1994).

De NOOY *et al.* (1996) oxidaram vários carboidratos monoméricos e poliméricos desprotegidos e verificaram seletividade de reação superior a 95% para hexoses piranosídicas, não detectando a formação de outros produtos que não uronatos. Foram relatadas em literatura a oxidação de amido de batata, inulina, dextrana e pululana (de NOOY *et al.*, 1994; de NOOY *et al.*, 1995; de NOOY *et al.*, 1996), enquanto SIERAKOWSKI *et al.* (2000, 2002) oxidaram seletivamente as galactomananas de *Leucaena leucocephala* e de *Cassia fastuosa*.

1.7 Vírus Herpes simplex tipo 1:

As doenças consequentes da infecção pelo vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) apresentam distribuição universal. Embora não sejam doenças de notificação compulsória nacional, o HSV-1 tem emergido com toda força em tempos de AIDS. Recém-nascidos e indivíduos com diminuição da imunidade celular secundária à AIDS ou quimioterapia anti-rejeição para transplante podem apresentar infecções disseminadas pelo vírus da herpes (SAMUELSON; LICHTENBERG, 1994; BRASIL, 2001).

O HSV-1 constitui a principal causa infecciosa de cegueira corneana e de encefalite esporádica fatal nos Estados Unidos (SAMUELSON; LICHTENBERG, 1994). Esse vírus está associado a lesões de membranas das mucosas e pele, na face e tronco, principalmente na cavidade oral (herpes orolabial). Após a infecção primária, o vírus pode permanecer em estado de latência em gânglios de nervos cranianos ou da medula e quando é reativado, o vírus migra através do nervo periférico, produzindo doença recidivante (BRASIL, 2001).

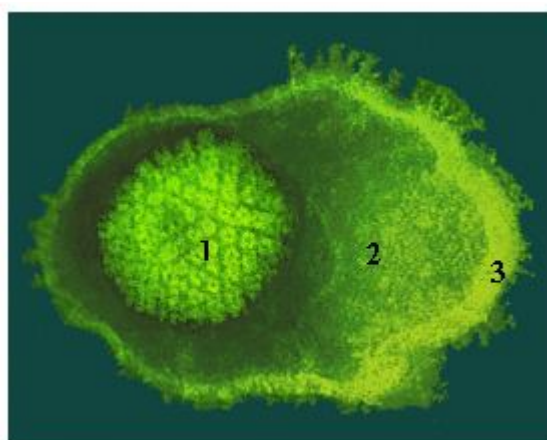


Figura 14: Fotomicrografia eletrônica do HSV-1, mostrando nucleocapsídeo (1), estroma (2) e envoltório lipídico (3) (<http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/herpes.html>).

O HSV-1 contém pelo menos 33 proteínas, 8 das quais são glicoproteínas de superfície do envelope viral (ROIZMAN; SEARS, 1990). As características gerais do vírus da família *Herpesviridae* (DULBECCO; GINSBERG, 1980^a; FENNER *et al.*, 1993) são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Características gerais dos membros da família *Herpesviridae*:

Característica	Especificação
Tamanho	180-200 nm
Simetria do capsídeo	Icosaédrica
Envoltório lipídico	Presente
Ácido nucléico	DNA de fita dupla
Local da biossíntese de DNA viral	Núcleo
Local da reunião das partículas virais	Núcleo e citoplasma
Corpos de inclusão	Intranucleares, eosinofílicos

Muitos tipos celulares suportam a multiplicação do vírus Herpes Simplex, sofrem alterações citopáticas e desenvolvem corpos de inclusão intranucleares. As alterações citopáticas são caracterizadas por aglomeramento das células e células gigantes multinucleares (sincícios) pela fusão de membranas (DULBECCO; GINSBERG, 1980^a; WHITLEY, 1990). Todos os herpesvírus conhecidos apresentam as seguintes propriedades biológicas (ROIZMAN, 1990):

- 1) Especificam um grande quadro de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos, síntese de DNA e, possivelmente, no processamento de proteínas.
- 2) A síntese do DNA viral e a montagem do capsídeo ocorrem no núcleo.
- 3) A produção da progênie viral infecciosa é invariavelmente seguida de destruição irreversível da célula infectada.
- 4) Permanecem latentes em seus hospedeiros (o genoma viral toma a forma de moléculas circulares e somente uma pequena porção de genes é expressa).

O processo de replicação viral (Figura 15, p. 29) inicia-se com a adsorção do vírus à membrana plasmática da célula hospedeira via glicoproteínas do envelope viral aos receptores celulares, um dos quais é o heparan sulfato, uma proteoglicana. O nucleocapsídeo penetra o citoplasma por fusão do envelope viral à membrana celular ou por meio de vacúolos de fagocitose. Um complexo DNA-proteína é liberado do nucleocapsídeo e entra no núcleo da célula, encerrando a síntese de macromoléculas da célula hospedeira (FENNER *et al.*, 1993).

Há transcrição seqüencial de 3 classes de mRNA, denominados α (imediatamente precoce), β (precoce) e γ (tardio). Os mRNAs α traduzem proteínas α que iniciam a transcrição de mRNAs β . A replicação viral se inicia utilizando algumas das proteínas α e β , muitas sendo enzimas e proteínas de ligação ao DNA, assim como proteínas da célula hospedeira. São transcritos mRNAs γ , estruturais. O DNA viral é replicado no núcleo e inserido em capsídeos pré-formados imaturos. Durante a maturação, os nucleocapsídeos adquirem um envelope lipoproteico ao deixarem o núcleo por brotamento. Essas partículas virais são acumuladas dentro de vacúolos no citoplasma e são liberadas por exocitose ou citólise (ROIZMAN; SEARS, 1990; FENNER *et al.*, 1993).

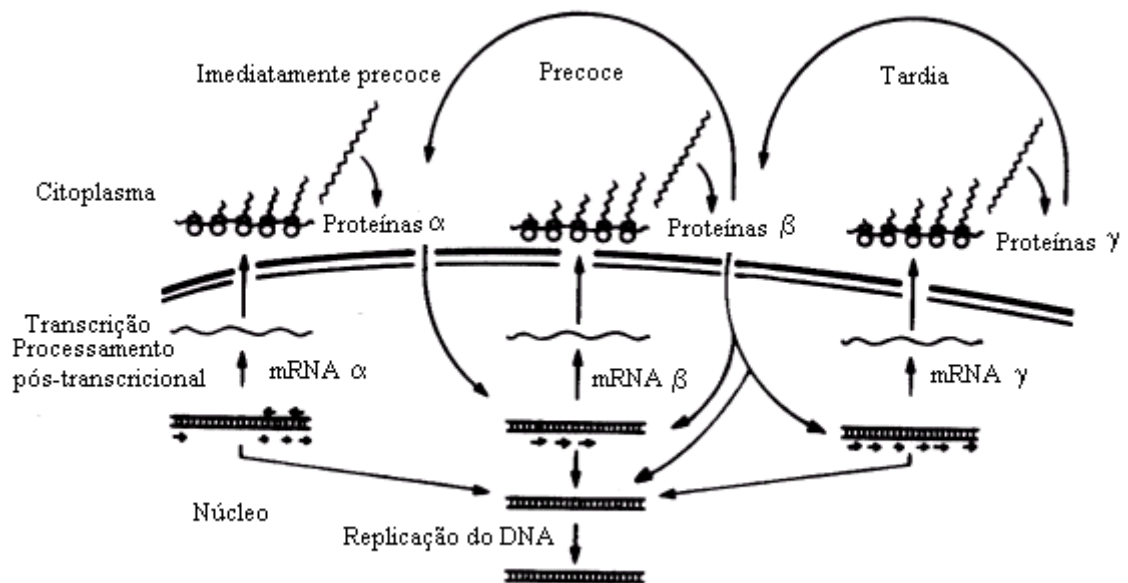


Figura 15: Diagrama representativo da transcrição, translação e replicação do DNA de HSV (FENNER *et al.*, 1993).

1.8 Tratamento antiviral corrente contra o HSV-1:

Muitos esforços têm sido dispendidos, nos últimos tempos, para o desenvolvimento de fármacos antivirais. A procura se baseia, principalmente, na descoberta de compostos que atuem inibindo seletivamente processos específicos dos vírus, como as etapas de adsorção na célula hospedeira, desnudamento viral, duplicação ou síntese macromolecular dirigida pelo vírus. Nesse sentido foram descobertos inúmeros compostos como os análogos de

nucleosídeos (zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina), os análogos de fosfato inorgânico (foscarnet), inibidores de proteases, entre outros (DOUGLAS Jr., 1991).

Para todas as formas de herpes simples, utiliza-se o aciclovir (BRASIL, 2001). Para vírus resistentes ao aciclovir (isolados de pacientes imunocomprometidos), são utilizadas drogas alternativas como o valaciclovir, penciclovir, famciclovir, foscarnet e cidofovir, todos análogos de nucleosídeos (STUART *et al.*, 1998; SNOECK, 2000).

Muitos vírus apresentam enzimas próprias que replicam preferencialmente ácidos nucleicos virais. O aciclovir é um análogo de nucleosídeo que atua como pró-droga pois necessita ser fosforilada para promover ação inibitória sobre a replicação viral. A chave para sua seletividade reside no fato de que a timidina quinase viral fosforila o aciclovir 200 vezes mais eficientemente que as enzimas celulares, presentes em células não infectadas. Portanto, a DNA polimerase celular é menos sensível ao aciclovir que a DNA polimerase viral (SANDER, 2001).

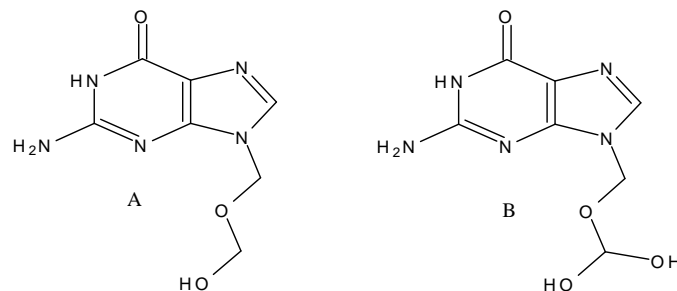


Figura 16: Estrutura do aciclovir (A) e estrutura do ganciclovir (B) (SANDER, 2001).

1.9 Dengue e febre amarela:

Os agentes causais da dengue e da febre amarela são flavivírus, apresentando, respectivamente, 4 e 1 subtipos antigênicos (MIMS *et al.*, 1995). O genoma dos flavivírus é um RNA de fita linear simples positiva que contém cerca de 11000 nucleotídeos que codificam proteínas estruturais (incorporadas nas partículas virais maduras liberadas) e não-estruturais (responsáveis pela replicação viral) (Figura 17, p. 31). São vírus pequenos (45-60 nm) com capsídeo icosaédrico e formato esférico (Figura 18, p. 31). O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica sobre a qual está ancorada a proteína E (50 kDa), que é

responsável pela fase inicial de infecção da célula hospedeira. A proteína E é o maior componente das projeções observadas na superfície do vírus por microscopia eletrônica e contém uma seqüência Arg-Gly-Asp envolvida na adesão ao heparan sulfato celular e na fusão do vírus à membrana endossomal. Fazem parte ainda da classe de proteínas estruturais a proteína M de membrana (7 kDa) e a proteína C de capsídeo (14 kDa) (Figura 19, p. 32). A montagem dos vírus acontece no retículo endoplasmático e os vírus imaturos não são capazes de fazer fusão com a membrana celular (nessa forma, a proteína E forma um complexo heterodimérico estável com a precursora da proteína M, a prM). Os vírus imaturos são transportados através da via endocítica celular e antes de serem liberados, a prM é clivada por uma protease na rede trans-Golgi para gerar partículas capazes de fazer a fusão (HEINZ; ALLISON, 2001).

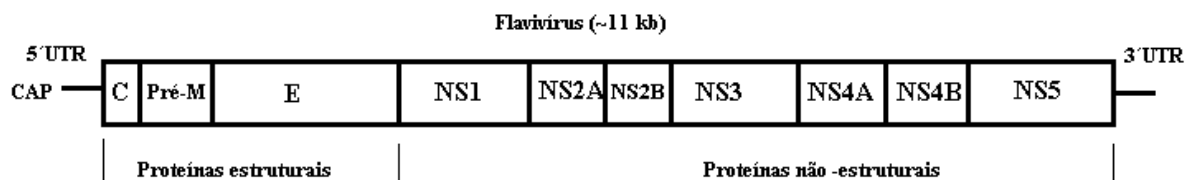


Figura 17: Genoma dos flavivírus (LEYSSSEN *et al.*, 2000).

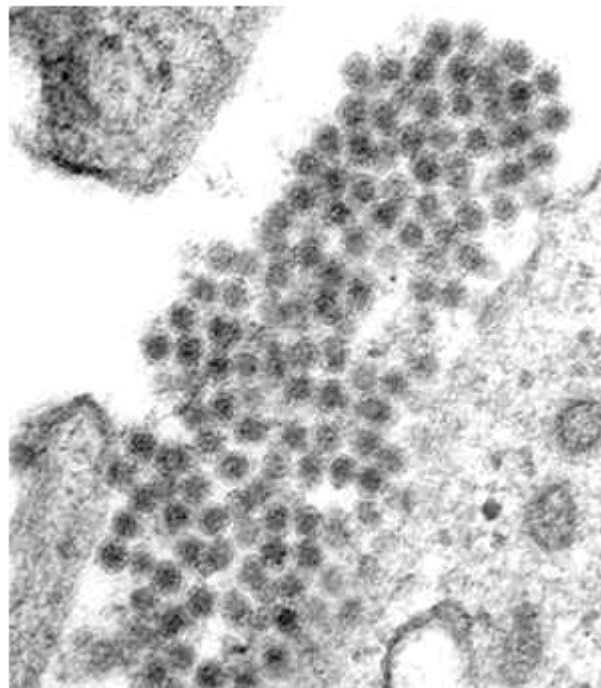


Figura 18: Fotomicrografia eletrônica de partículas virais maduras de dengue – 2 sendo liberadas, com aumento original de 123000x (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/electron-micrograph.htm>).

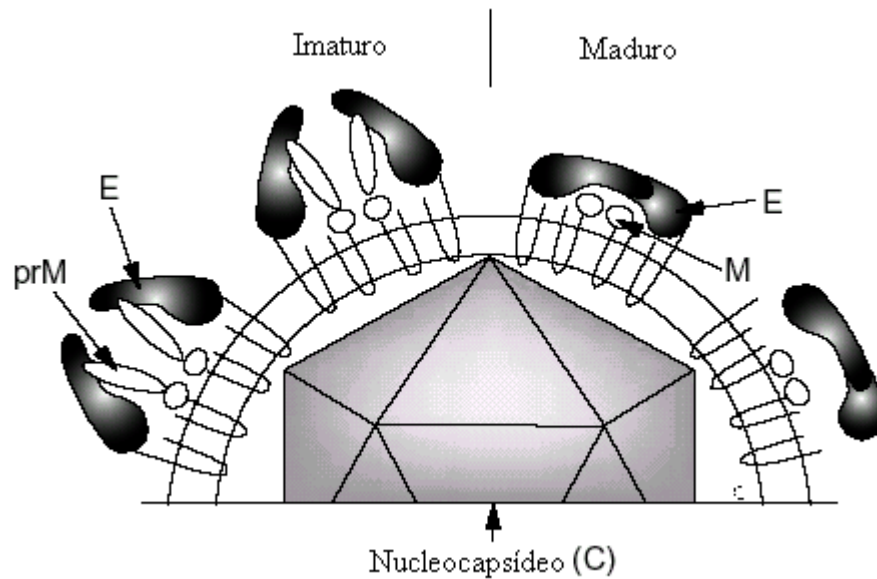


Figura 19: Diagrama esquemático da composição de flavivírus imaturos e maduros (HEINZ; ALLISON, 2001).

No ciclo de replicação viral apresentado na Figura 20 (p. 33), os flavivírus interagem com o heparan sulfato presente na membrana da célula hospedeira e isso permite que os vírus se concentrem na superfície celular. O vírus então se liga com alta afinidade a outro receptor ou co-receptor e sofre endocitose. A fusão do envelope viral com a membrana do endossomo libera o nucleocapsídeo no citosol, onde é desmontado liberando o RNA de fita simples positiva. A sequência 5' não traduzida (5'UTR) dirige o RNA aos ribossomos que o traduzem a uma poliproteína. A poliproteína é processada co e pós-translacionalmente em proteínas virais funcionais. A RNA polimerase, dependente de RNA, produz RNA de fita simples negativa que serve de molde para a produção do genoma viral. Após a replicação, o genoma viral é encapsidado e dirigido ao retículo endoplasmático, onde, durante a passagem para o lúmen, adquire envelope lipídico. Os vírus maduros são então liberados para o espaço extracelular (LEYSSSEN *et al.*, 2000).

O vírus da dengue apresenta um ciclo de transmissão através de mosquitos *Aedes spp.* – primatas não-humanos nas florestas pluviais da Ásia e da África, porém, nas grandes cidades já existe um ciclo urbano bem estabelecido de transmissão *Aedes aegypti* – humanos (GUBLER, 1998). Após a picada do mosquito infectado, o vírus tem um período de incubação médio de 4 –7 dias, seguido de febre alta e sintomas inespecíficos como mal-estar, cefaléia, náusea e vômito, com duração média de 6 dias, período virêmico onde o vírus se replica nos monócitos e endotélio vascular (MONATH, 1996; MIMS *et al.*, 1995, BRASIL,

2000^a). No dengue clássico, podem aparecer ainda dor retro-orbital, exantema, prurido cutâneo, hepatomegalia dolorosa e pequenas manifestações hemorrágicas como petéquias, epistaxe, gengivorragia, sangramento gastrointestinal, hematúria e metrorragia. Na febre hemorrágica do dengue (FHD), os casos típicos são caracterizados por manifestações hemorrágicas, com trombocitopenia e hemoconcentração, após o início dos sintomas de dengue clássico, durante ou logo após uma pequena queda na temperatura. Quando ocorre o choque (síndrome do choque dengue - SCD) devido a falência circulatória gerada pelo aumento da permeabilidade vascular (geralmente entre 3-7 dias do início dos sintomas), pode haver o óbito. (GUBLER, 1998; BRASIL, 2003^a). Não há terapia antiviral ou vacina disponível comercialmente contra o dengue. O tratamento é, portanto, apenas sintomático.

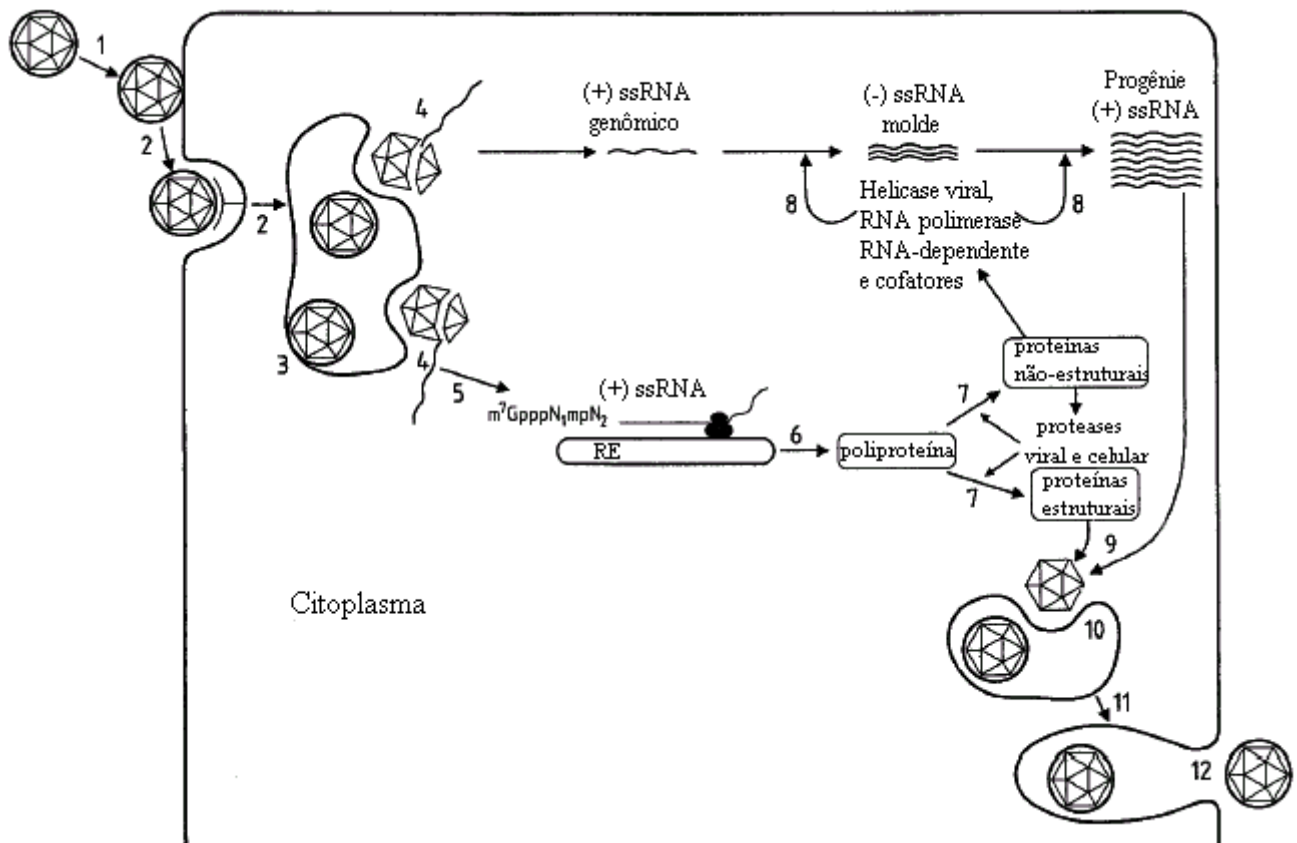


Figura 20: Ciclo de replicação dos flavivírus (LEYSEN *et al.*, 2000).

1.10 Atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados:

A atividade antiviral *in vitro* é uma propriedade biológica dos polissacarídeos sulfatados que é cientificamente explorada. Em trabalhos realizados com o vírus Herpes simplex (HSV) e o vírus da Imunodeficiência humana (HIV) foi relatado que a presença de grupos sulfato na molécula é essencial para a propriedade antiviral, relacionando o potencial antiviral a uma inibição do ataque viral às células hospedeiras por impedir o processo de adesão necessário à internalização do vírus. Esses mesmos estudos vêm tentando encontrar relações lógicas entre a propriedade antiviral e a estrutura química/grau de sulfatação dos polissacarídeos sulfatados, como xilogalactanas (DAMONTE *et al.*, 1996), galactanas (AMORNRUT *et al.*, 1999), carragenanas (CARLUCCI *et al.*, 1997), glucanas (dextranas sulfatadas) (NEYTS *et al.*, 1995) e mananas (KOLENDER *et al.*, 1997) que têm apresentado baixo ou nenhum potencial citotóxico, nas concentrações efetivas para exercer a atividade antiviral.

O Grupo de Carboidratos da UFPR vem investigando a propriedade antiviral de polissacarídeos sulfatados contra o vírus Herpes simplex. Dentro desses estudos, que envolveram polissacarídeos de algas, TULIO (1998) e DUARTE *et al.* (2001) fizeram a análise estrutural de galactanas naturalmente sulfatadas da alga vermelha *Bostrychia montagnei*, relacionando a atividade anti-herpética com a presença de grupos sulfato em C-6 das unidades de β -D-galactopiranoose das frações estudadas. MAJCZAK (1999) e MAJCZAK *et al.* (2001) analisaram a atividade de heterofucanas sulfatadas extraídas da alga parda *Sargassum stenophyllum*, com atividade anti-herpética contra o HSV-1, cujas frações obtidas apresentaram concentração inibitória 50% na faixa de 0,15 a 5,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, relacionando a atividade ao grau de sulfatação das moléculas. Os autores avaliaram a atividade antiviral por meio da redução do número de unidades formadoras de placas. DUARTE *et al.* (2004) avaliaram a atividade antiviral de agaranas extraídas de diferentes frações obtidas da alga vermelha *Acantophora spicifera* frente ao HSV-1 e HSV-2, observando valores de CI50 entre 0,8-0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sem efeito citotóxico, para a molécula mais ativa.

Por outro lado, diferenciando-se da linha seguida por MAJCZAK (1999) e TULIO (1998), ONO *et al.* (1998, 1999^a, 1999^b) estudaram a atividade antiviral e a citotoxicidade dos derivados sinteticamente sulfatados de galactomananas extraídas de sementes de *Cassia fastuosa* (DS 0,23) e de *Mimosa scabrella* (DS 1,1). A atividade biológica foi avaliada contra o vírus HSV-1 a 10^3 x dose infectiva 50% (DI50), *in vitro*, através da análise dos resultados

utilizando a metodologia de Reed e Muench (DULBECCO; GINSBERG, 1980^b). Nessa metodologia de avaliação da atividade antiviral, são utilizadas microplacas de 98 orifícios e a CI50 é dada pela concentração da droga necessária para inibir o aparecimento de efeito citopático em metade dos poços de uma determinada coluna da placa. Independente da intensidade do efeito, contam-se como positivos todos os poços que contenham efeito citopático. Para a galactomanana sulfatada de *C. fastuosa* (Man/Gal ~ 3,0), verificou-se que essa inibiu o aparecimento de efeito citopático acima de 71 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, após 24 h de incubação e, após 48 h, todas as unidades infectadas na presença do polissacarídeo desenvolveram efeito citopático, porém bem menos intenso que os controles (essa diminuição de intensidade de citopaticidade não pôde ser avaliada pela metodologia utilizada). Para a galactomanana sulfatada de *Mimosa scabrella* (Man/Gal ~ 1,2) observou-se uma CI50 na concentração de 16,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ONO *et al.*, 1998; ONO *et al.*, 1999^a; ONO *et al.*, 1999^b). Esses resultados sugeriram a necessidade de utilização da metodologia de redução de unidades formadoras de placas para melhor avaliação da atividade antiviral e da síntese de derivados com maior grau de sulfatação, uma vez que as CI50 obtidas poderiam ser menores do que as expressas com a metodologia de Reed e Muench (DULBECCO; GINSBERG, 1980^b).

WITVROUW e de CLERCK (1997) fizeram um levantamento de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas já anteriormente isolados por outros autores e realizaram um estudo comparativo de atividade antiviral *in vitro* (contra o HIV-1 e HIV-2), envolvendo ainda dextranas e xilanas sinteticamente sulfatadas. Diferenças na interação desses poliânions com diferentes sorotipos de HIV indicaram algum grau de especificidade dos polissacarídeos testados. Observaram acentuado aumento na atividade anti-HIV-1 quando houve aumento da massa molar de 10^3 a 10^4 , estacionando entre 10×10^3 - 50×10^3 em amostras apresentando o mesmo grau de sulfatação. Já contra o sorotipo HIV-2, essa relação se mostrou oposta, com a fração de massa 10^3 apresentando-se mais inibitória que massas maiores.

Tem-se atribuído a atividade antiviral apresentada por polissacarídeos sulfatados a um mecanismo de inibição do primeiro passo envolvido na replicação viral, que é a adesão do vírus à célula hospedeira, no mesmo tipo de interação que ocorreria entre as glicoproteínas virais e o heparan sulfato naturalmente existente na superfície da célula hospedeira (HEROLD *et al.*, 1995).

IBRAHIM *et al.* (1999) questionaram o papel do heparan sulfato de superfície celular como facilitador da infecção viral. Os autores trataram linfócitos de sangue periférico (PBL) com heparitinase e a remoção de qualquer traço de heparan sulfato não alterou a susceptibilidade das células à infecção por certas estirpes de HIV-1.

GONZÁLEZ *et al.* (1987^a, 1987^b) propuseram um mecanismo de ação anti-herpética para carragenanas diferente da de inibição da adsorção viral à superfície celular. Utilizando vírus marcados radioativamente com [³⁵S]-metionina, verificaram que houve inibição da replicação na presença de carragenana, quando adicionada ao meio até 1 hora antes da infecção com o HSV-1, mas que não existia uma interferência sobre a adesão ou penetração do vírus na célula. Sugeriram que os polissacarídeos seriam internalizados na presença do vírus e que exerceriam a atividade antiviral através da inibição da expressão do genoma por interação com ácidos nucleicos.

Os polissacarídeos sulfatados parecem exercer atividade anti-herpética por meio de diferentes mecanismos de ação: carragenanas da alga *Stenogramme interrupta* apresentaram CI50 entre 0,65 e 9,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com indícios de que a atividade estaria sendo exercida na etapa de adsorção, visto que não apresentaram atividade virucida e foram desprovidas de ação quando adicionadas ao meio após a adsorção viral (CÁCERES *et al.*, 2000); diferentes carragenanas (tipos λ , κ/ι e μ/ν) apresentaram atividade contra os vírus HSV-1 e HSV-2 entre 0,4 e 3,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 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 a concentrações entre 0,19 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra HSV-1 e HSV-2, apresentando atividade virucida somente a concentrações 10 a 1000 vezes maiores que a CI50, exercendo a ação durante o período de adsorção (MAZUMDER *et al.*, 2002).

SANO (1997) relatou que a condroitina sulfatada era capaz de promover agregação de partículas do vírus do mosaico do tabaco (TMV), observada por microscopia eletrônica, reduzindo o número de lesões locais produzidas em folhas de tabaco (Figura 21).



Figura 21: Representação esquemática baseada em micrografias eletrônicas de TMV purificado na presença (a) e na ausência (b) de condroitina (SANO, 1997).

Em vista dos bons resultados de atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos *in vitro* (a baixas concentrações e sem citotoxicidade), alguns estudos envolvendo a utilização em humanos foram realizados. FLEXNER *et al.* (1991) administraram dextrana sulfatada a pacientes com HIV sintomático durante 14 dias pela via intravenosa, a uma concentração plasmática 200 vezes superior à CI50 *in vitro*, relatando aumento nos níveis do antígeno viral p24 e indícios de toxicidade como trombocitopenia e alopecia. Através da administração intraperitoneal de dextrana sulfatada a pacientes com AIDS, SHAUNAK *et al.* (1998) observaram ausência de toxicidade e diminuição na viremia e no título de antígeno p24, sugerindo diminuição da replicação do HIV-1 nesses pacientes. A administração intravenosa de curdulana sulfatada em indivíduos infectados com HIV e CMV (GORDON *et al.*, 1997) levou 12 de 21 pacientes CMV positivos a CMV negativos sem a toxicidade relatada anteriormente para a dextrana sulfatada.

Alguns polissacarídeos que apresentam atividade antiviral *in vivo* na ausência de atividade *in vitro* podem exercer essa ação atuando como imunomoduladores. SIDWELL *et al.* (1994) relataram que glucomanas de *Candida utilis*, previamente conhecidas por suas funções estimuladoras de macrófagos, indutora de IL-2 e estimuladora da atividade de células matadoras naturais, inibiam a morte de camundongos infectados com o vírus Punta Toro (PTV) quando administrados pela via intraperitoneal. SMEE *et al.* (1996) avaliaram a atividade anti-PTV da goma tragacanta de *Astragalus brachycentrus* sobre a infecção de camundongos e observaram que, mesmo desprovida de atividade antiviral *in vitro*, o tratamento intraperitoneal com doses entre 12,5 e 200 mg.kg⁻¹.dia⁻¹, administradas 24 h antes ou 4 e 24 h depois da inoculação viral, protegiam a maioria dos animais da morte. O pré-tratamento desses animais com injeção de sílica (tóxico aos macrófagos) levava à perda da atividade antiviral, sugerindo que os polissacarídeos poderiam estar exercendo a atividade antiviral através da ativação de macrófagos intraperitoneais.

A atividade imunoestimulatória de polissacarídeos é relatada por vários autores: PATCHEN *et al.* (1992) demonstraram que a administração intravenosa de uma β -(1→3)-glucana em camundongos, previamente à irradiação letal por raios gama, aumentava a sobrevivência dos animais, devido ao aumento da atividade dos macrófagos (diminuindo infecções oportunistas) e acelerando a reconstituição hematopoiética; IRINODA *et al.* (1992) demonstraram que a administração intranasal de lentinana (uma glucana ramificada) a camundongos antes da infecção com uma dose de DL75 do vírus Influenza conferia proteção ao animal e que havia atividade aumentada de macrófagos bronco-alveolares nos animais tratados; a lentinana também apresentou atividade antitumoral contra vários tipos de tumores

sem apresentar citotoxicidade direta, com indicativos de que a ação seria exercida através da atividade citotóxica de macrófagos peritoneais (por meio da indução de secreção de fator de necrose tumoral por essas células) (KERÉKGYÁRTÓ *et al.*, 1996); HAN *et al.* (1998) demonstraram em estudos *in vitro* que a angelana, uma glucana extraída de *Angelica gigas* Nakai promovia ativação direta de células B, macrófagos e células matadoras naturais, e, ativação indireta de células T auxiliares, aumentando de maneira coordenada as funções imunes *in vivo*, como produção de anticorpos. O aumento da atividade fagocitária *in vivo* foi observado em camundongos tratados com uma galactana de sementes de *Centrosema pubescens* (SILVA; TOSTES; PARENTE, 2000), com uma glucana extraída de frutos de *Orbignya phalerata* (SILVA; PARENTE, 2001) e com galactomanana de sementes de *Trigonella foenum-graecum* L. (RAMESH; YAMAKI; TSUSHIDA, 2002). MORETÃO *et al.* (2003, 2004), observaram que a arabinogalactana ácida de *Anadenanthera colubrina* promoveu *in vitro* a ativação de macrófagos peritoneais de camundongos de modo dependente de tempo e de dose (82% de células ativadas a uma dose de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 24 horas de exposição); os autores estudaram a atividade antitumoral desse polissacarídeo contra o Sarcoma 180, observando um aumento na produção do fator de necrose tumoral α pelos macrófagos peritoneais de camundongos tratados.

Não há relatos de investigação, até o presente momento, envolvendo atividade antiviral de polissacarídeos modificados sobre os vírus da dengue. Com relação ao vírus da febre amarela, há apenas um relato de estudo que envolveu a varredura de várias substâncias para atividade antiviral contra a cepa 17D, entre elas a dextrana sulfatada, por NEYTS *et al.* (1996). A dengue e a febre amarela são doenças de importância no país, e, negligenciadas em termos de terapia medicamentosa específica. Daí, a tentativa de se encontrar um agente de origem natural e/ou quimicamente modificado, poderia constituir uma forma para minimizar os problemas e prejuízos causados por tais doenças de interesse nacional.

2. OBJETIVOS:

2.1 Gerais:

Utilizar galactomananas extraídas de sementes de *Mimosa scabrella*, *Leucaena leucocephala*, e de *Cassia fastuosa* para obter derivados sulfatados e urônico/sulfatados, empregando-os em testes de atividade antiviral contra os vírus HSV-1, YFV (cepa BeH111) e DEN-1 (cepa Hawaii) e realizar análise química estrutural para obtenção de dados de relação estrutura/atividade biológica.

2.2 Específicos:

Este trabalho teve por objetivos específicos:

- Extrair e purificar as galactomananas de *Mimosa scabrella*, *Leucaena leucocephala*, e de *Cassia fastuosa*.
- Derivatizar as diferentes galactomananas por sulfatação e/ou oxidação específica dos grupos CH₂OH-6.
- Analisar a homogeneidade, o grau de oxidação e/ou sulfatação por métodos químicos e físico-químicos.
- Caracterizar comparativamente as galactomananas nativas de sementes de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* e os seus derivados sulfatados, utilizando técnicas de RMN de ¹H e ¹³C, uni e bidimensionais .
- Avaliar a propriedade antiviral *in vitro* dos polissacarídeos nativos e modificados contra o vírus HSV-1.
- Avaliar a toxicidade e a propriedade antiviral *in vitro* (sobre cultivo celular) e *in vivo* (sobre camundongos) dos derivados sulfatados de galactomananas de *M. scabrella* (BRS) e de *L. leucocephala* (LLS) contra os vírus da dengue (subtipo 1) e da febre amarela selvagem.

- Determinar os índices de neutralização (em testes de desafio) contra o vírus da febre amarela selvagem do soro de camundongos tratados simultaneamente com vírus e os derivados sulfatados BRS e LLS.
- Avaliar a atividade anticoagulante dos derivados sulfatados BRS e LLS.

3. METODOLOGIA:

3.1 Extração e purificação dos polissacarídeos:

As sementes de *Mimosa scabrella*, *Leucaena leucocephala* e de *Cassia fastuosa* (colhidas em Curitiba – PR; *M. scabrella*: doação do IAP-PR-1994, *L. leucocephala*: no Departamento de Química–UFPR-2000; *Cassia Fastuosa*: na sede da antiga Faculdade de Farmácia da UFPR, situada à rua Coronel Dulcídio-1999) foram submetidas à inativação enzimática em água fervente por 30 minutos. Após trituração em liquidificador sob velocidade reduzida, as sementes (200 g) foram submetidas à extração aquosa (10 vezes 1,5 L de água destilada, 30-60 min cada) em temperatura ambiente até exaustão, sob agitação.

O extrato foi filtrado e o filtrado centrifugado a 8000 rpm por 15 min (centrífuga Janetzki T24). Ao extrato centrifugado e concentrado a 50°C sob pressão reduzida em rotaevaporador, adicionou-se NaCl para concentração final de 0,1 M (a solubilidade da maioria das proteínas é aumentada em baixas concentrações de sais, processo conhecido como *salting-in*), seguindo-se de precipitação do polissacarídeo com etanol comercial (2 volumes). O precipitado foi filtrado, lavado 2 vezes com etanol comercial e 1 vez com acetona PA. O polissacarídeo foi seco em estufa a 40°C.

Os polissacarídeos brutos foram ressolubilizados em água, seguindo-se centrifugação a 30200 g por 15 min e filtração por membranas de acetato de celulose (3 µm de diâmetro de poro) e precipitados com 2-3 volumes de etanol, procedendo-se a secagem em estufa a 40°C.

3.2 Métodos gerais:

As dosagens de proteínas foram realizadas através do método de HARTREE (1972), as de açúcar total através do método de DUBOIS et al. (1956) e as de açúcar redutor segundo o método de SOMOGYI (1945) e NELSON (1944). As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas segundo o método de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973), utilizando-se padrões de ácido galacturônico e ácido manurônico, com leitura a 540 nm. A determinação do grau de sulfatação foi feita por método turbidimétrico por precipitação com cloreto de bário (DODGSON; PRICE, 1962).

Para a determinação da composição monossacarídica, amostras dos polissacarídeos (10 mg) foram hidrolisadas em ácido trifluoracético (TFA) 1 M, durante 5 h, em banho de água fervente (ADAMS, 1965), os monossacarídeos produzidos foram reduzidos com NaBH₄ e neutralizados com resina LEWATIT S-100 (H⁺), lavados com metanol e os alditóis, após

secos, foram acetilados em piridina/anidrido acético (1/1) durante 15 h a temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis foram analisados por GLC (WOLFROM; THOMPSON, 1963) em um cromatógrafo líquido-gasoso, modelo HP5890 (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR) usando coluna capilar DB-225 (temperatura inicial de 50°C e elevação até 220°C, 4°C/min, com detector e injetor a 250°C, utilizando nitrogênio como gás de arraste).

3.3 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 pastilhas de KBr.

3.4 Determinação da homogeneidade e da massa molar:

Através de cromatografia de exclusão estérica acoplada com detectores de índice de refração e de espalhamento de luz de multi-ângulos (HPSEC-MALLS, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR). A amostra solubilizada em NaNO₂ 0,5 g.L⁻¹ e filtrada (0,22 µm) foi injetada no cromatógrafo contendo colunas Ultragel 2000, 500, 250 e 120, acopladas a refratômetro diferencial, modelo Waters 2410 e um detector de espalhamento de laser multiângulos, modelo DAWN DSP-F (Wyatt Technology). Como eluente foi utilizado NaNO₂ 0,5 g.L⁻¹, contendo azida de sódio, a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. Os resultados foram analisados através do software ASTRA 4.70.07 (WYATT, 1993).

3.5 Obtenção dos derivados urônicos e/ou sulfatados dos polissacarídeos a serem utilizados em testes de atividade antiviral:

Para a oxidação seletiva de álcool primário (CH₂OH-6) a ácido, os polissacarídeos (1 g) foram solubilizados em água destilada (500 mL) e resfriados a 4°C. Adicionou-se NaOCl (0,3 mL a 12%), NaBr (4,6 mg) e TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) (0,5 mg), com ajuste constante de pH para 9,3 e sob atmosfera de nitrogênio. A determinação do consumo de NaOH necessário para o ajuste do pH até o final do tempo de reação foi utilizada para determinar a porcentagem de grupo ácido formado. A reação de oxidação foi interrompida pela adição de NaBH₄ (16 mg por 0,1 mmol de OH primário), etanol (20 mL) e neutralizada para pH 7,0 com ácido acético 0,1 M (de NOOY *et al.*, 1996; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000). O rendimento de oxidação (RO) que indica a razão entre a concentração em mmoles oxidados e

a concentração em mmoles oxidáveis (unidades que apresentam CH_2OH -6 livres) foi calculado através da seguinte equação:

RO: (concentração molar de ácidos urônicos)/{(quantidade de açúcar total/162).[(Man)/(Man+Gal)]}, onde a concentração molar de ácidos urônicos foi determinada através da medida de consumo de NaOH durante a reação de oxidação ou por dosagem química e Man = valor referente à manose e Gal = valor referente à galactose na relação Man:Gal obtida por análise de GLC dos acetatos de alditóis das amostras hidrolisadas.

Os derivados sulfatados foram sintetizados conforme descrito por O'NEILL (1955), para isso, 1 g de polissacarídeo foi dissolvido em piridina (160 mL), mantendo-se o sistema a 25°C sob agitação (12 h) até que uma suspensão fina se formasse. O sistema foi resfriado a 3°C e o ácido clorossulfônico (13 mL) foi adicionado lentamente e sob constante agitação. Adicionou-se formamida (30 mL), observando total solubilização do material em suspensão, mantendo o sistema sob agitação e resfriamento por mais 24 h. O sistema foi neutralizado com solução saturada de NaHCO_3 , dialisado contra água corrente (120 h) e água destilada, centrifugado (8800 rpm, 25 min), filtrado em membranas de acetato de celulose (0,22 mm), tratado com NaCl para uma concentração final de 0,1 M e precipitado com 2 volumes de etanol comercial. O DS, que é definido como o grau de sulfatação do polissacarídeo, indica a porcentagem de unidades monossacarídicas da molécula que se apresentam substituídas por um grupamento sulfato, foi calculado através da seguinte equação:

DS= 162. [(S)/(3200 - 102.S)], onde S = porcentagem de enxofre (GERMANO, 1996).

Purificação por Cetavlon (SCOTT, 1965): os derivados sulfatados foram solubilizados a 2 g.L⁻¹ em água destilada, adicionando-se em seguida solução de Cetavlon a 3% (relação Cetavlon:derivado sulfatado de 2:1 para *Mimosa scabrella* e de 5:1 para *Leucaena leucocephala*). O complexo insolúvel foi centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos, ressolubilizando o complexo com NaCl 4 M (3x o volume gasto de Cetavlon 3%) e corrigindo-se o pH para 7,0 com ácido acético. Os derivados foram precipitados com etanol comercial (2 volumes), secos em estufa 40°C, ressolubilizados em água destilada, dialisados contra água corrente, adicionados de NaCl para concentração final de 0,1 M e, novamente precipitados com etanol comercial (1,5 volumes para o derivado de *M. scabrella* e 0,5 volumes para o de *L. leucocephala*).

Para a utilização nos testes, os polissacarídeos em concentrações abaixo de 1 g.L⁻¹ foram esterilizados por filtração em membrana de acetato de celulose de 0,22 µm e acima dessa, por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

3.6 Despolimerização parcial dos derivados sulfatados por oxidação com $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{++}$:

A reação de degradação descrita a seguir baseia-se na metodologia de NARDELLA *et al.* (1996) e de JOUAULT *et al.* (2001). Foram solubilizados 200 mg de derivado sulfatado em 10 mL de água destilada, ajustando-se o pH para 7,5 com solução de NaOH 2 e 0,1 M. Adicionou-se 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, corrigindo-se novamente o pH para 7,5 com NaOH 2 M e ácido acético glacial, sob agitação constante. O peróxido de hidrogênio (1,8%) corrigido para pH 7,5 foi adicionado lentamente em um período de 2,5 h (volume total: 30 mL), com o sistema sob aquecimento em banho-maria a 60°C. Adicionou-se resina Amberlite forma H^+ até pH 3-4, e o filtrado foi neutralizado a pH 5-6, sendo dialisado por 16 h sob água corrente e 6 horas em água destilada em membrana de diálise com massa de corte média de 13000 Da. O material dialisado foi então liofilizado.

3.7 Ressonância magnética nuclear de carbono-treze (RMN- ^{13}C) e hidrogênio (RMN- ^1H):

Os espectros foram obtidos em espectrômetros BRUKER, modelo AVANCE-DRX-400 (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR) e AVANCE-DMX-500 (CENAUREMN – DQOI - UFC), acoplados a transformador de Fourier. As amostras foram dissolvidas em água deuterada e analisadas a 30°C, 50°C ou 70°C, dependendo da amostra, com os deslocamentos químicos (δ) sendo expressos em p.p.m, relativos ao padrão interno acetona ($\delta_{1\text{H}}$: 2.225 ppm e $\delta_{13\text{C}}$: 30.2 ppm). As análises por RMN (GORIN; MAZUREK, 1975; GORIN, 1981), envolveram técnicas mono (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C desacoplado) e bidimensionais (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HMQC, HMBC, TOCSY e ROESY).

Quando analisados no espectrômetro modelo AVANCE-DRX-400, as frequências de observação dos núcleos foram de 100 MHz (^{13}C) e de 400 MHz (^1H) e quando analisados no modelo AVANCE-DMX-500, foram de 125 MHz (^{13}C) e de 500 MHz (^1H).

Os espectros unidimensionais foram obtidos em sonda inversa de 5 mm (RMN- ^1H de BR, BRS, BRSD, LL, LLS e LLSD, a 30°C ou 50°C, com auxílio do microprograma *zgpr*, com um intervalo de pulso (*DI*) de 1,0 s e um tempo de aquisição (*AQ*) de 2,0 s, usando uma faixa espectral (*SWH*) de 8,25 kHz (DRX-400) ou 4,00 kHz (DMX-500), número de varreduras (*NS*) de 155 (DRX-400) ou 8 (DMX-500) e pulso de 90° (6,70 μs no modelo DRX-400 e 10,00 μs no DMX-500); RMN- ^{13}C de BR e LL, a 70°C e de BRSD e LLSD, a 50°C, no modelo DRX-400, com auxílio do microprograma *zgdc*, com *DI*: 0,1 s, *AQ*: 0,59 s,

SWH: 31,75 kHz, *NS*: 10000, pulso de 90°: 11,90 μ s) ou em sonda direta de 10 mm (RMN-¹³C de BRS e LLS, a 70°C, no modelo DRX-400, através do microprograma *zgdc*, com *DI*: 0,1 s, *AQ*: 0,59 s, *SWH*: 31,75 kHz, *NS*: 60000, pulso de 90°: 11,70 μ s – e, ¹³C-DEPT 135 de BRS e LLS, a 70°C, no modelo DRX-400, com auxílio do microprograma *dept135*, com o ângulo variável da seqüência de pulsos θ : 135°, o que promove o aparecimentos de sinais de CH e CH₃ em fase positiva e CH₂ em fase negativa).

Todos os experimentos bidimensionais foram obtidos em sonda inversa de 5 mm. Os espectros de COSY de BR, BRS, LL e LLS foram obtidos a 50°C, no modelo DMX-500, com auxílio do microprograma *cosyprqf*, utilizando uma matriz 2K x 256, *NS*: 32, *DI*: 1,0 s. O espectro de COSY de BRSD foi obtido a 50°C, no modelo DRX-400, com auxílio do microprograma *cosypr*, utilizando uma matriz 512 x 256, *NS*: 32, *DI*: 2,0 s.

Os espectros de TOCSY de BR, BRS, LL e LLS foram obtidos a 50°C, no modelo DMX-500, com auxílio do microprograma *mlevphpr*, utilizando uma matriz 2K x 256, *NS*: 32, *DI*: 1,0 s e tempo de mixagem (*MT*) de 100 ms. Os espectros de TOCSY de BRSD e LLSD foram obtidos a 50°C, no modelo DRX-400, com auxílio do microprograma *mlevprtp*, utilizando uma matriz 512 x 512, *NS*: 32, *DI*: 2,0 s, *MT*: 100 ms.

Os espectros de ROESY de BR, BRS, e LL foram obtidos a 50°C, no modelo DMX-500, com auxílio do microprograma *roesyphpr*, utilizando uma matriz 2K x 256, *NS*: 64, *DI*: 1,0 s.

Os espectros de HMQC de BRSD e LLSD foram obtidos a 50°C, no modelo DRX-400, com auxílio do microprograma *invbprtp*, utilizando uma matriz 2K x 512, *NS*: 32, *DI*: 1,5 s.

Os espectros de HMBC de BRSD e LLSD foram obtidos a 50°C, no modelo DRX-400, com auxílio do microprograma *inv4lplrnd*, utilizando uma matriz 4K x 256, *NS*: 64, *DI*: 2,0 s.

3.8 Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de *C. fastuosa*, *M. scabrella* e de *L. leucocephala* contra o HSV-1 *in vitro*:

A cepa do vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) foi comprada do American Type Culture Collection pelo Laboratório de Virologia do Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires, Buenos Aires – Argentina, sob responsabilidade do Prof. Carlos A. Pujol, e chegou ao Brasil através do convênio desse com o Prof. Miguel D. Nosedá, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. O potencial antiviral dos polissacarídeos sulfatados/urônicos *in vitro* contra a replicação do HSV-1 foi baseado na

inibição do efeito citopático vírus induzido (DAMONTE *et al.*, 1996), no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti – Curitiba - PR (Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento).

Foi utilizada metodologia de avaliação da atividade antiviral baseada na redução do número de placas, com placas de 24 orifícios infectadas com 100 unidades formadoras de placas (UFP) por orifício (DAMONTE *et al.*, 1996; TULIO, 1998) e polissacarídeos em diferentes concentrações. Foram incubadas 200×10^3 células por poço (0,8 mL de meio Eagle com 8% de soro fetal bovino, 37°C, 5% CO₂) e após fechamento da monocamada celular (24-48 h), a suspensão viral era adicionada juntamente como polissacarídeo (volume total de 0,1 mL por poço, ambos solubilizados em meio Eagle sem soro fetal bovino). Após 1 h de adsorção, adicionava-se a cada poço 0,9 mL de meio Eagle com 8% de soro fetal bovino e 1,4% de metilcelulose, realizando a leitura depois de 72-96 h (contagem do número de placas de efeito citopático em microscópio invertido).

3.9 Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* em células C6/36:

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). O clone C6/36 de células de mosquito *Aedes albopictus* (SINGH, 1967; IGARASHI, 1978) foi cultivado em microplacas de 96 poços em Meio Leibovitz n° 15 modificado (suplementado com 4% de soro fetal bovino, 2% de aminoácidos não-essenciais, 3% de meio triptose fosfato em pH 6,8), nas microplacas de 96 poços, adicionando-se a seguir os polissacarídeos (em diferentes concentrações) e incubando-os em contato com as células. Após 8 dias a 28°C, as células foram incubadas com MTT e o formazan formado solubilizado em DMSO, com leitura a 492 nm (subtraindo-se a absorbância inespecífica obtida a 620 nm) em leitor de ELISA. A concentração citotóxica 50% (CC50) foi determinada como a concentração de polissacarídeo capaz de reduzir o número de células viáveis em 50% do número de células do controle. Os experimentos foram realizados na Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz – SP.

3.10 Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* contra o YFV (BeH111) e o DEN-1 (Hawaii) *in vitro*:

Para a determinação da concentração inibitória 50% (CI50) frente ao vírus da febre amarela selvagem, YFV – cepa BeH111, e dengue 1, DEN-1 (cepa Hawaii) em placas de poliestireno de 24 poços, foram preparadas monocamadas de células C6/36, inoculando-se o vírus a uma diluição 100 vezes mais concentrada que a dose infectiva 50% (DI50), juntamente com soluções do polissacarídeo em diferentes concentrações (150 µL por poço) na etapa de adsorção. A diluição de polissacarídeo correspondente à CI50 é a diluição em que é capaz de inibir a imunofluorescência em 50% dos poços, sendo calculada pelo método de Reed e Muench (DULBECCO; GINSBERG, 1980^b), após 8 dias de incubação em estufa de CO₂ (5%) a 28°C.

Para o ensaio de imunofluorescência, procedeu-se da seguinte maneira: uma suspensão celular de cada poço da microplaca foi adicionada a um poço da lâmina de microscopia de 12 poços. Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram imersas em acetona por 10 minutos e as células foram então examinadas para presença do antígeno viral através de imunofluorescência indireta (GUBLER, 1984) utilizando soro policlonal anti-flavivírus diluído e anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugada a fluoresceína em microscópio de imunofluorescência.

A atividade antiviral contra os vírus da febre amarela (cepa BeH111) e da dengue 1 (cepa Hawaii) também foi avaliada através da infecção simultânea do vírus a 100 DI50 e polissacarídeos em diferentes concentrações (1,8 mL) em garrafas T25 de poliestireno (Corning) (8 dias a 28°C). Cada sobrenadante do teste foi novamente titulado (por imunofluorescência) em microplacas de 24 poços, assim como o controle positivo contendo apenas o vírus a 100 DL50. Determinou-se, então, a concentração do polissacarídeo capaz de promover uma queda de 100 vezes no título viral dado pelo controle positivo. Os experimentos foram realizados na Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz – SP.

3.11 Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* in vivo:

O protocolo de experimentos em animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo e realizado de acordo com a Resolução 196/96 (BRASIL, 2002) do Conselho Nacional de Saúde do Brasil.

Camundongos recém-nascidos (*Mus musculus*) de 2-3 dias (n: 6) foram inoculados pela via intracerebral com 20 μ L de solução de NaCl 0,85% (m/v) contendo polissacarídeo (BR, BRS, LL ou LLS) em diferentes concentrações (31 mg.L⁻¹- 8 g.L⁻¹), correspondendo a uma dose de 82 μ L por 20,5 g de massa animal. No grupo controle, foram inoculados com solução de NaCl 0,85%. Após a inoculação, os camundongos foram observados durante 14 dias, sendo considerado indicativo de toxicidade, a morte do animal durante o período de observação.

Camundongos fêmeas de 25-30 dias (n: 6) foram inoculados pela via intraperitoneal com 1 mL de solução de NaCl 0,85% (m/v) por 20,5 g de massa animal, contendo polissacarídeo (BR, BRS, LL ou LLS) em diferentes concentrações (0,6-5,0 g.L⁻¹). No grupo controle, foram inoculados com solução de NaCl 0,85%. Os camundongos receberam 7 aplicações em dias diferentes, sendo observados e pesados durante 14 dias. Considerou-se indicativo de toxicidade, a morte do animal ou diminuição de massa com relação ao grupo controle durante o período de observação. Para determinar se houve diferença significativa de ganho de massa diária com relação ao grupo controle, aplicou-se o teste *t*, com um nível de significância de 0,02 (BOLTON, 1990). Os experimentos foram realizados na Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz – SP.

3.12 Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* contra YFV (BeH111) e DEN-1 (Hawaii) in vivo:

O vírus da febre amarela (YFV – cepa BeH111) foi fornecido pelo Instituto Evandro Chagas, Belém – Pará e o vírus dengue tipo 1 (DEN-1, cepa Hawaii) pelo Centro de Controle de Doenças, San Juan – Porto Rico.

Camundongos recém-nascidos de 2-3 dias (n: 6) foram inoculados pela via intracerebral com 20 μ L de solução de NaCl 0,85% (m/v) contendo polissacarídeo (BR, BRS, LL ou LLS) em diferentes concentrações (inferiores a 0,5 g.L⁻¹) e suspensão de vírus (febre amarela – cepa BeH111, dengue 1 – cepa Hawaii e dengue 2 – cepa Trinidad) para 100 DL50

(dose letal 50%). No grupo controle negativo inoculou-se solução de NaCl 0,85% e no grupo controle positivo, suspensão viral a 100 DL50 em NaCl 0,85%. Após a inoculação, os camundongos foram observados durante 14 dias, para aparecimento de sintomas de doença por encefalite e morte.

Camundongos fêmeas de 25-30 dias (3 grupos de 19 animais) foram inoculados pela via intraperitoneal com 1 mL de solução de NaCl 0,85% (m/v) por 20,5 g de massa animal, contendo galactomanana sulfatada (BRS ou LLS) a 1 g.L^{-1} e suspensão viral (febre amarela – cepa BeH111) para 25 DL50. Os grupos controles negativos foram inoculados com solução de polissacarídeo 1 g.L^{-1} (BRS ou LLS) em NaCl 0,85% por 20,5 g de massa animal e o grupo controle positivo, com suspensão viral a 25 DL50 em NaCl 0,85%. Os camundongos foram observados durante 14 dias, para aparecimento de sintomas de doença por encefalite e morte.

Em um segundo experimento com fêmeas jovens adultas, os animais (n: 6) foram inoculados com suspensão viral (febre amarela – cepa BeH111) a 25 DL50 e tratados com BRS ou LLS a 1 g.L^{-1} pela via intraperitoneal (dose de 49 mg.kg^{-1}), 3 e 4 dias após a inoculação do vírus e observados por 14 dias.

Para os testes em camundongos recém-nascidos e fêmeas jovens adultas, a suspensão viral foi obtida a partir de cérebro de camundongos recém-nascidos doentes após inoculação intracerebral do vírus. Os experimentos foram realizados na Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz – SP.

3.13 Realização de teste de desafio e determinação dos índices de neutralização contra o YFV (BeH111) do soro de camundongos tratados simultaneamente com vírus e os derivados BRS e LLS:

Camundongos fêmeas de 25-30 dias (3 grupos de 19 animais) foram inoculados pela via intraperitoneal com 1 mL de solução de NaCl 0,85% (m/v) por 20,5 g de massa animal, contendo galactomanana sulfatada (BRS ou LLS) a 1 g.L^{-1} e suspensão viral (febre amarela – cepa BeH111) para 25 DL50. Nos grupos controles negativos foram inoculados com solução de polissacarídeo 1 g.L^{-1} (BRS ou LLS) em NaCl 0,85% por 20,5 g de massa animal e no grupo controle positivo, com suspensão viral a 25 DL50 em NaCl 0,85%. Um grupo controle também foi inoculado com uma suspensão viral a 25 DL50 em NaCl 0,85% inativada por formaldeído. Os camundongos foram observados durante 14 dias, para aparecimento de sintomas de doença por encefalite e morte. Após 25 dias de inoculação, os camundongos sobreviventes (3 grupos de 5 animais) foram desafiados com uma suspensão viral a 37,5 DL50.

Os diferentes grupos foram:

- 1) controle negativo previamente inoculado com BRS;
- 2) controle negativo previamente inoculado com LLS;
- 3) controle negativo primeiramente inoculado com salina 0,85%;
- 4) grupo teste inoculado previamente com suspensão viral + BRS;
- 5) grupo teste previamente inoculado com suspensão viral + LLS;
- 6) controle inoculado previamente com suspensão viral inativada pelo formaldeído.

Após o desafio, os camundongos foram observados durante 50 dias. Um teste de neutralização (SHOPE; SATHER, 1979) em camundongos recém-nascidos foi realizado com um conjunto de soros de camundongos pré-desafio (n: 5), para a determinação dos índices de neutralização de anticorpos contra o vírus da febre amarela selvagem. As amostras de soros (obtidas por punção intracardíaca) foram incubadas com diluições crescentes (10^{-1} a 10^{-11}) de suspensão viral por 1 h a 37°C . Grupos de 6 camundongos recém-nascidos (2-3 dias de idade) foram inoculados intracerebralmente e observados durante 14 dias quanto à morte. Os experimentos foram realizados na Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz – SP.

3.14 Determinação da atividade anticoagulante (Tempo Parcial de Tromboplastina Ativada – APTT) das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala*:

As amostras foram submetidas ao teste de Tempo Parcial de Tromboplastina Ativada (APTT), em aparelho COAG-A-MATE XM (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR), com duas leituras por ponto, usando plasma normal humano liofilizado, kit Cefamat 300 e curva de heparina ($183 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$) como padrão. Para o teste foram incubados 0,02 mL da amostra solubilizada em NaCl 0,85%, em diferentes concentrações ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ - $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), com 0,10 mL de plasma normal humano (Uniplasmatrol – Biomérieux) e 0,1 mL de cefalina ativada, sendo a reação disparada pela adição de CaCl_2 0,025 M (0,1 mL), sendo marcado o tempo necessário para a formação do coágulo (PIRES *et al.*, 2001; FISCHBACH; FOGDALL, 1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 Extração e purificação do polissacarídeo:

O conteúdo de galactomananas em sementes de leguminosas e a relação Man:Gal desses polímeros parece estar relacionada com a evolução das espécies nessa família. BUCKERIDGE *et al.* (1995) extraíram os polissacarídeos de sementes de 28 espécies brasileiras e, juntamente com outras 23 espécies previamente estudadas, verificaram que a evolução das subfamílias *Mimosoideae* e *Faboideae* a partir de *Caesalpinioideae* se fez com redução do conteúdo de galactomananas das sementes, paralelamente a um aumento do grau de substituição dessas. Os autores sugerem que as galactomananas poderiam ser importantes fatores de adaptação dessas espécies aos climas tropical úmido, semi-árido e árido.

São apresentados, no presente trabalho, os resultados referentes à extração de polissacarídeos de sementes de *Cassia fastuosa*, *Leucaena leucocephala* e de *Mimosa scabrella*.

As espécies *Leucaena leucocephala* e *Mimosa scabrella* são classificadas dentro da subfamília *Mimosoideae* e *Cassia fastuosa* em *Caesalpinioideae*. Os rendimentos dos polissacarídeos brutos e purificados por centrifugação e filtração (Tabela 7) são maiores para a extração em sementes de *M. scabrella* (32,0 e 22,2% respectivamente) e de *C. fastuosa* (31,4 e 19,3% respectivamente) do que o de *L. leucocephala* (17,5 e 13,3% respectivamente). A análise dos acetatos de alditóis das galactomananas hidrolisadas também mostrou menor relação Man:Gal e portanto maior substituição na galactomanana de sementes das espécies pertencentes à subfamília *Mimosoideae* (Tabela 8, p. 52).

Tabela 7: Rendimento de galactomananas extraídas de sementes de *C. fastuosa*, *L. leucocephala* e de *M. scabrella*:

Espécie	Massa de sementes (g)	Rendimento de amostra bruta (%)	Rendimento de amostra purificada* (%)
<i>C. fastuosa</i>	150,2	31,4	19,3
<i>L. leucocephala</i>	200,2	17,5	13,3
<i>M. scabrella</i>	212,9	32,0	22,2

*a purificação foi realizada por centrifugação a 13000 rpm e filtração por membrana de acetato de celulose (diâmetro de poro de 3 µm).

Tabela 8: Análise dos acetatos de alditóis dos polissacarídeos hidrolisados de sementes de *C. fastuosa*, *L. leucocephala* e *M. scabrella* por GLC:

Espécie	Relação Molar **	
	Manose	Galactose
<i>Cassia fastuosa</i>	2,92 ± 0,50 *	1
<i>Leucaena leucocephala</i>	1,44 ± 0,13 *	1
<i>Mimosa scabrella</i>	1,14 ± 0,15 *	1

* α : 0,05

** Coluna DB-225

BUCKERIDGE *et al.* (1987) obtiveram rendimentos de galactomanana de sementes de *L. leucocephala* entre 9,7 e 15,7% e relação molar Man:Gal de ~ 2,0. SIERAKOWSKI *et al.* (2000) obtiveram uma relação Man:Gal de ~ 1,6 e McCLEARY (1979), num estudo sobre a estrutura molecular e interação de galactomanana de *L. leucocephala* com xantana, observaram também uma relação de ~ 1,6, indicando possíveis variações devido às diferenças nos locais de colheita, diferenças sazonais, diferentes metodologias de extração e de hidrólise empregadas.

TAVARES (1994) obteve rendimento de 32,2% para extração aquosa sem purificação por centrifugação e filtração por membrana de acetato de celulose a 20°C de sementes de *Cassia fastuosa*, comparável ao rendimento de polissacarídeo bruto (31,4%, Tabela 7, p. 51). O autor obteve relação Man:Gal de aproximadamente 4:1, maior que 2,9:1 (Tabela 8). Resultados semelhantes ao de TAVARES (1994) foram obtidos por GERMANO (1996), com rendimento de 30% e relação Man:Gal de 4,0:1. PETKOWICZ (1998^a) obteve relação Man:Gal de 3,0:1 em extração aquosa da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* a 4°C.

A galactomanana mais substituída é a de sementes de *M. scabrella* (Man:Gal ~ 1,14 ± 0,15), seguida da de *L. leucocephala* (Man:Gal ~ 1,44 ± 0,13) e da de *C. fastuosa* (Man:Gal ~ 2,92 ± 0,50). GANTER (1988) obteve a mesma relação Man:Gal para a galatomanana de *M. scabrella*.

A utilização desses três polissacarídeos permitiu que se pudesse trabalhar com galactomananas contendo diferentes graus de substituição por unidades de galactose para a síntese dos derivados sulfatados, urônicos e urônico/sulfatados.

4.2 Obtenção de polissacarídeos modificados por oxidação e/ou sulfatação:

Esta etapa do trabalho teve por objetivo fazer uma varredura de derivados que pudessem ser testados posteriormente contra os vírus YFV (cepa BeH111) e DEN-1 (cepa Hawaii) em experimentos *in vitro* e *in vivo*. O vírus HSV apresenta-se como bom modelo de estudo para a avaliação da atividade antiviral dos compostos em estudo por ser um vírus de rápido crescimento (a avaliação da atividade pode ser obtida em curto espaço de tempo), apresenta efeito citopático, o que permite a avaliação da sua replicação por visualização microscópica (com menor custo que técnicas mais específicas como a imunofluorescência), pode ser cultivado em células VERO (de fácil manutenção) e o nível de biossegurança exigido em laboratórios é de grau II (básico).

Estudos anteriores de atividade antiviral envolvendo galactomananas sinteticamente sulfatadas de sementes de leguminosas (*Mimosa scabrella* e *Cassia fastuosa*) (ONO *et al.* 1998 e 1999), onde a CI_{50} _{galactomanana sulfatada de *M. scabrella* (DS 1,1)} = 16,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, já mostravam o potencial como candidatas a drogas anti-herpéticas desses derivados. A metodologia de avaliação utilizada nesses experimentos foi a da redução do número de poços com efeito citopático em placas de 96 poços, analisada pelo teste de Reed e Muench (DULBECCO; GINSBERG, 1980^b), de valor qualitativo.

É provável que outros derivados polieletrólitos de galactomananas também possam ter atividade antiviral, portanto propôs-se a síntese de derivados urônicos, através de oxidação específica em C-6, utilizando o reagente TEMPO como catalisador, gerando grupamentos ácidos carboxílicos, derivados sulfatados e derivados urônico/sulfatados (contendo grupamentos carboxílicos e sulfatos).

As curvas de oxidação das galactomananas de *M. scabrella*, de *L. leucocephala* e de *C. fastuosa* (Figura 22, p. 54) para síntese dos derivados urônicos foram obtidas através da construção de um gráfico (volume de NaOH gasto para neutralização x tempo de reação). A análise das respectivas curvas de oxidação mostrou que a velocidade de oxidação decresce da galactomanana menos substituída para a mais substituída, na seguinte seqüência: galactomanana de *C. fastuosa* (2,9:1, 368 min, 43 ml de NaOH), *L. leucocephala* (1,4:1, 558 min, 34,2 mL) e de *M. scabrella* (1,1:1, 427 min, 21,8 mL), provavelmente devido ao fato das galactomananas menos substituídas apresentarem mais hidroxilas primárias livres (C-6). As reações foram terminadas através da adição de etanol e borohidreto de sódio nos tempos de 368 min (*C. fastuosa*, 3,8 mmoles de ácido urônico - determinado pela quantificação de grupos ácidos formados através da medida de NaOH consumido para manutenção do pH 9,3;

3,3 mmoles oxidáveis existentes; grau de oxidação: 1,15), 558 min (*L. leucocephala*, com 3,0 mmoles de ácido urônico; 2,7 mmoles oxidáveis; grau de oxidação: 1,11), 427 min (*M. scabrella*, 2,3 mmoles de ácido urônico; 2,4 mmoles oxidáveis; grau de oxidação: 0,96). As dosagens de ácido urônico utilizando o método de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973) indicaram os seguintes rendimentos de oxidação (RO): CFO: 0,80, LLO: 0,64, BRO: 0,78, todos abaixo dos valores previstos com o consumo de base durante a reação de oxidação. Provavelmente, houve degradação paralela, aumentando, assim o número de unidades de carbonos primários oxidáveis. SIERAKOWSKI *et al.* (2000) obtiveram uma galactomanana oxidada de *L. leucocephala*, com um RO de 0,66, semelhante ao obtido nesse trabalho. Os outros derivados são inéditos. Apenas o derivado LLO (de *L. leucocephala*) alcançou um platô de consumo de NaOH, embora para todos, a velocidade de consumo de NaOH tenha diminuído no momento em que a reação foi interrompida.

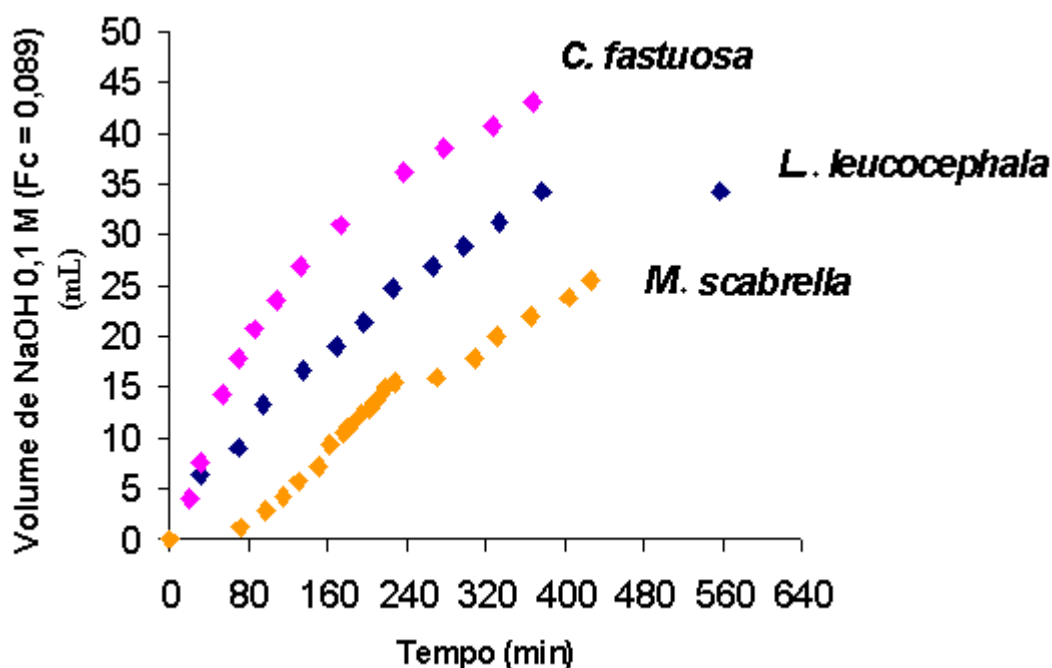


Figura 22: Perfis de oxidação a 4 °C com NaOCl, NaBr e TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) com ajuste constante de pH para 9,3 das 3 galactomananas de sementes de *C. fastuosa*, *L. leucocephala* e de *M. scabrella*.

4.3 Determinação da atividade antiviral *in vitro* contra o HSV-1:

A síntese dos derivados urônico/sulfatados poderia produzir amostras com inserção de grupos sulfatos em carbonos não-primários. Os rendimentos de oxidação e de sulfatação são resumidos na Tabela 9 (p. 56). Os derivados cujas siglas iniciam por BR, referem-se aos derivados de galactomanana de *M. scabrella*, os que iniciam por CF, aos derivados de galactomanana de *C. fastuosa*, e os que iniciam por LL, aos de *L. leucocephala*. As terminações “S” indicam derivados sulfatados, “O” indicam urônicos (oxidados) e “OS”, derivados urônicos (oxidados)/sulfatados. As amostras sem as terminações “S”, “O” ou “OS” indicam galactomananas não derivatizadas. As amostras BRH1 e BRH1,5 são galactomananas de *M. scabrella* que foram submetidas à hidrólise parcial em HCl em pH 1,0 e 1,5, respectivamente.

Para o teste de atividade antiviral, todas as amostras foram diluídas a uma concentração inicial de 5 mg.mL⁻¹ para que pudessem ser esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm de poro. As amostras apresentaram diferentes graus de dificuldade de filtração, apresentando perdas por retenção nas membranas. Para que pudessem ser testadas as concentrações máximas obtidas após a filtração e diluição em meio apropriado, não se padronizou a mesma concentração para todas as amostras nessa primeira etapa de investigação das amostras com potencial anti-herpético.

Nessa etapa inicial, as amostras não derivatizadas BRH1, BRH1,5 e CF, não apresentaram atividade antiviral (Tabela 9, p. 56), não induzindo redução do número de unidades formadoras de placas virais (UFP) com relação aos controles infectados apenas com o HSV-1. A amostra BR reduziu em 61% o número de UFP, mas ainda não foram realizados estudos utilizando-se diluições menores (abaixo de 395 µg.mL⁻¹) dessa amostra, para se determinar a concentração inibitória 50% (CI50). A amostra LL também não foi testada pois não foi possível realizar a filtração a uma concentração inicial de 5 mg.mL⁻¹. Os derivados apenas oxidados apresentaram baixo ou nenhum efeito de inibição das UFP. Os derivados sulfatados e os urônicos/sulfatados apresentaram boa atividade antiviral e, dentre esses, os que apresentaram melhor potencial (maior atividade em menores concentrações) foram os derivados BR-S, BROS, LL-S e LLOS, ou seja, os derivados de galactomananas com maior grau de substituição (menor relação Man:Gal). Observa-se que esses derivados apresentam maior DS que os de galactomanana de *C. fastuosa*, embora tenham-se utilizado as mesmas condições de reação durante a síntese dos mesmos. Porém, visando-se a racionalização dos

experimentos de análise estrutural, os estudos posteriores foram direcionados sobre os derivados BR-S, BROS, LL-S e LLOS.

Tabela 9: Derivados de galactomananas sintetizados para teste de atividade antiviral contra o HSV-1:

Derivado	Concentração testada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	DS	Rendimento de oxidação	Controle positivo (UFP)	Porcentagem média de inibição	Limites ($\alpha:0,05$)
BRH1	1296	NE	ND	53	0	ENS
BRH1O	1664	NE	0,87	53	0	ENS
BRH1OS	1202	0,57	0,85	53	95	70 a 100%
BRH1,5	1255	NE	NE	56	0	ENS
BRH1,5O	192	NE	0,64	56	0	ENS
BRH1,5OS	487	1,4	0,87	56	93	67 a 100%
BR	395	NE	NE	56	61	55 a 67%
BR-S	670	1,4	NE	56	100	96 a 100%
BRO	654	NE	0,80	56	15	3 a 27%
BROS	252	0,80	0,51	56	96	71 a 100%
CF	768	NE	NE	52	0	ENS
CFS	1131	0,22	NE	52	91	76 a 100%
CFO	1066	NE	0,78	52	31	14 a 48%
CFOS	1218	0,30	0,86	52	94	68 a 100%
LL-S	248	0,60	NE	140	90	84 a 96%
LLOS	320	0,33	0,40	52	98	73 a 100%

DS: grau de derivatização por sulfatação; ENS: diferença estatisticamente não significativa com relação ao controle; NE: não existente.

Após essa investigação preliminar, foram testadas diferentes concentrações dos derivados de melhor atividade para a determinação da CI50, sendo encontrados os valores de $0,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para BR-S (DS:1,4, Controle: 140 UFP) (Figura 23, p. 57) e $14,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para BROS (DS:0,80 Controle: 98 UFP) (Figura 24, p. 57). O derivado LL-S (DS 0,6, controle: 140 UFP) (Figura 25, p. 58) apresentou 77% redução do número de placas a uma concentração de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e LLOS (DS: 0,33, controle = 51 UFP) (Figura 26, p. 58), 60,5% de redução a $3,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo necessário ainda que sejam testadas concentrações inferiores a essas para a determinação da CI50.

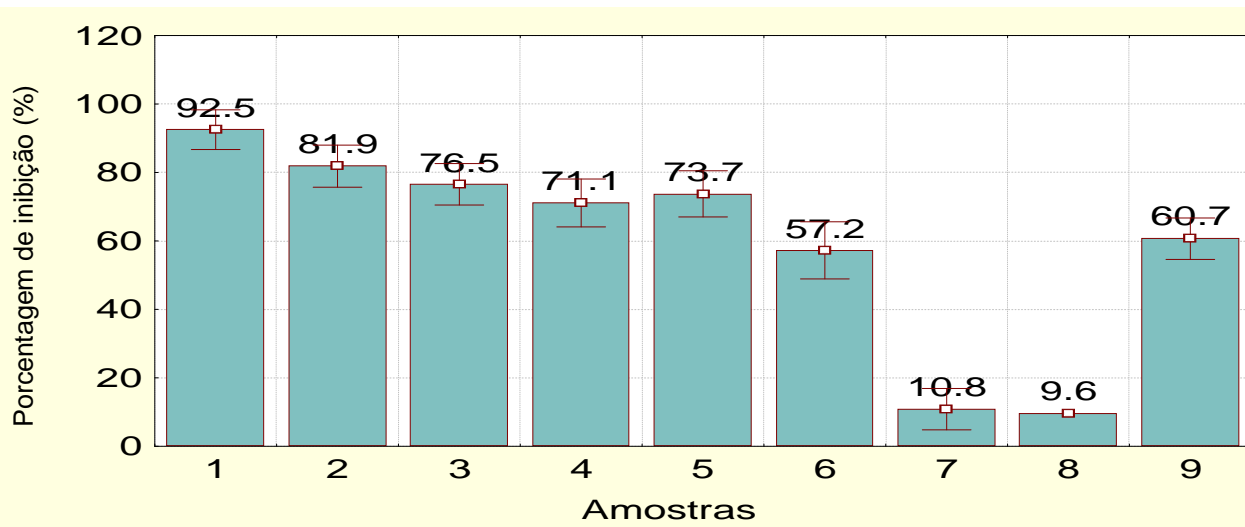


Figura 23: Avaliação da atividade antiviral (anti-HSV-1) de BR-S através da redução das unidades formadoras de placas (UFP) com relação a um controle. n: 4, α : 0,05. Controle Positivo: 140 UFP/poço. Concentrações das amostras (expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): 1) 670; 2) 84; 3) 10,5; 4) 3,7; 5) 1,3; 6) 0,45; 7) 0,16; 8) 0,06; 9) BR: 395.

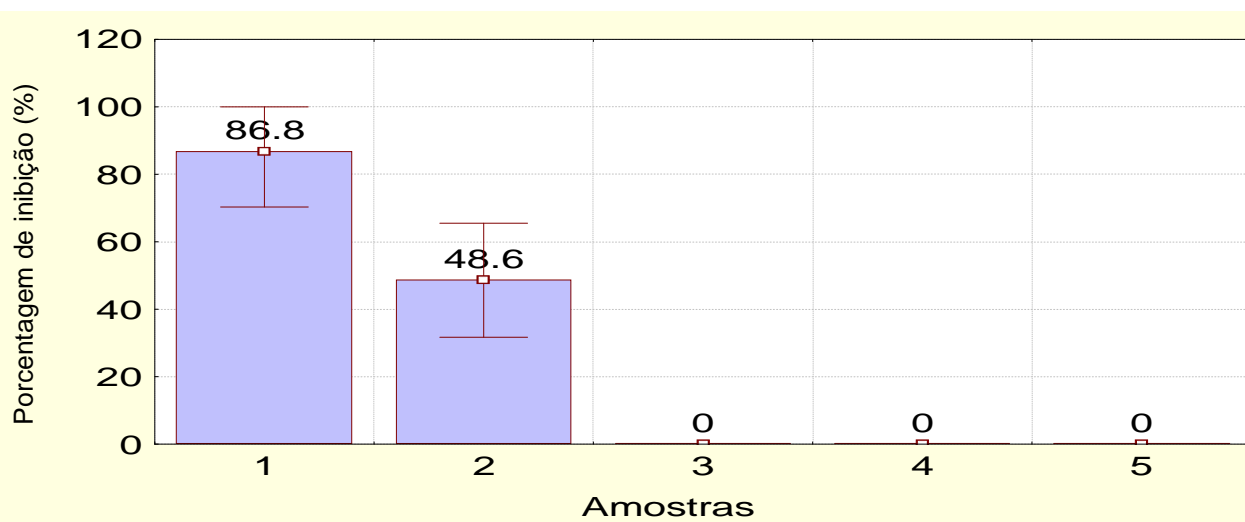


Figura 24: Avaliação da atividade antiviral (anti-HSV-1) de BROS através da redução das unidades formadoras de placas (UFP) com relação a um controle. n: 4, α : 0,05. Controle Positivo: 98 UFP/poço. Concentrações das amostras (expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): 1) 42; 2) 14; 3) 4,7; 4) 1,6; 5) BRO: 109.

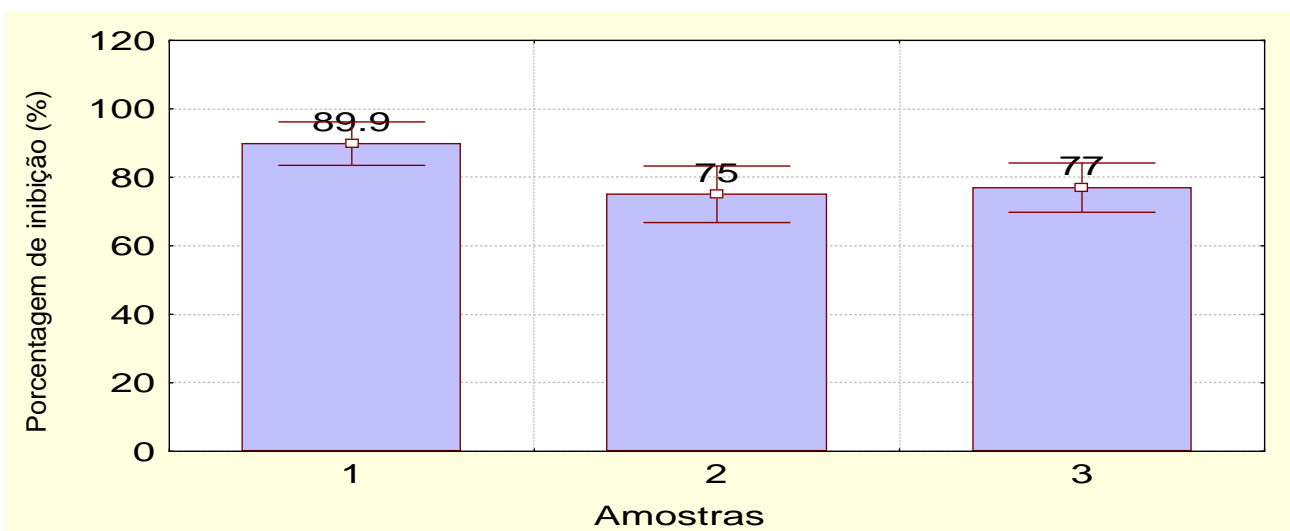


Figura 25: Avaliação da atividade antiviral (anti-HSV-1) de LL-S através da redução das unidades formadoras de placas (UFP) com relação a um controle. n: 4, α : 0,05. Controle Positivo: 140 UFP/poço. Concentrações das amostras (expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): 1) 248; 2) 31; 3) 4.

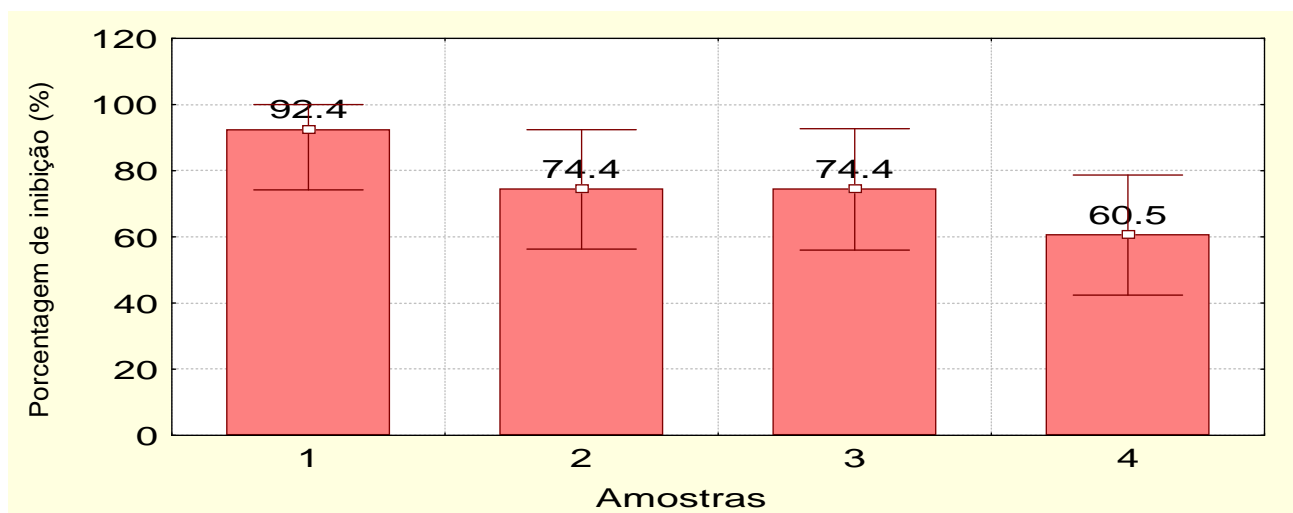


Figura 26: Avaliação da atividade antiviral (anti-HSV-1) de LLOS através da redução das unidades formadoras de placas (UFP) com relação a um controle. n: 4, α : 0,05. Controle Positivo: 51 UFP/poço. Concentrações das amostras (expressas em $\mu\text{g.mL}^{-1}$): 1) 204; 2) 51; 3) 13; 4) 3,2.

4.4 Obtenção, purificação e análise da homogeneidade e massa molar dos derivados sulfatados utilizados em teste de atividade antiviral contra o YFV (cepa BeH111) e DEN-1 (cepa Hawaii):

Foi sintetizado, em maior quantidade, novo lote de derivados sulfatados de galactomananas de *M. scabrella*, denominado BRS, e de *L. leucocephala*, denominado LLS, para os testes de atividade antiviral contra os arbovírus. As análises químicas desses derivados mostraram que os mesmos apresentaram graus de derivatização (DS) semelhantes entre si (Tabela 10).

Tabela 10: Dosagens de açúcar total, proteína e sulfato dos compostos avaliados em testes de toxicidade e atividade antiviral contra YFV (cepa BeH111) e DEN-1 (cepa Hawaii):

Derivado	Açúcar Anidro Total ^a (%)	Proteína Total ^b (%)	Sulfato ^c (%)	DS ^d
BRS	58,4	1,3	15,3	0,62
LLS	61,1	4,1	14,3	0,50

^a DUBOIS et al. (1956); ^b HARTREE (1972); ^c DODGSON; PRICE (1962); ^d grau de sulfatação.

Os polissacarídeos ácidos podem ser separados dos neutros através da precipitação dos complexos insolúveis formados entre os poliânions e cátions presentes como o cetiltrimetilamônio. Os derivados pós - purificação por Cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) foram obtidos com rendimentos de 75,2% e 84,5%, após precipitação com etanol, para BRS e LLS, respectivamente, sendo que o derivado LLS não produziu precipitado separável por centrifugação nas condições indicadas e, portanto, a recuperação de 84,5% da massa inicial poderia ter decorrido da utilização de menor concentração de etanol na precipitação de LLS (0,5 volume). O cátion cetiltrimetilamônio produziria um sal insolúvel na presença de poliânions, que seria separado dos polímeros neutros por centrifugação.

As análises de infravermelho (Figuras 27 e 28, p. 60) evidenciam o aparecimento de banda de vibração de estiramento axial de S=O em torno de 1250 cm⁻¹ (TURVEY, 1965; FALSHAW; FURNEAUX, 1998) em BRS e LLS, que está ausente nas amostras nativas BR e LL. A região de absorção em torno de 820 cm⁻¹ (sulfato equatorial) a 850 cm⁻¹ (sulfato axial) de vibração C-O-S que poderia trazer informação com relação à posição de substituição dos grupos sulfatos não foi observada, provavelmente devido ao baixo grau de sulfatação das

amostras. Porém, outras análises (de varredura de uma região mais estreita do espectro, entre 700 e 900 cm^{-1}) deverão ser realizadas para a melhor definição dessa região.

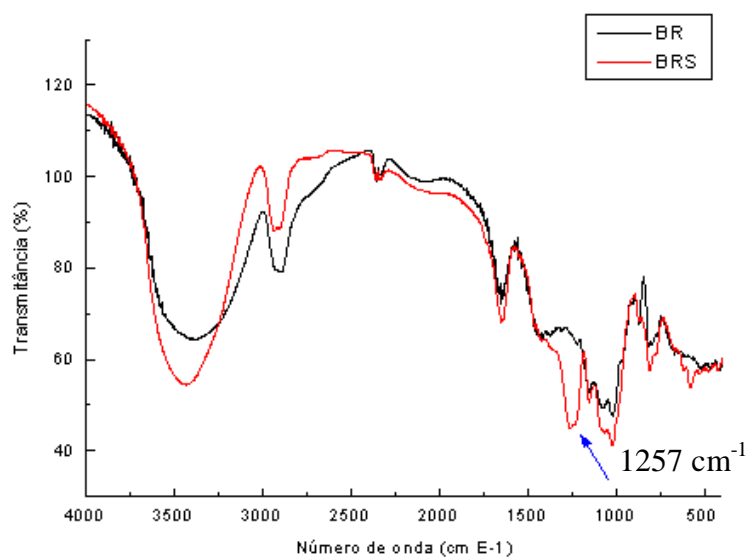


Figura 27: Espectros de infravermelho da galactomanana nativa (BR) e sulfatada (BRS) de sementes de *M. scabrella* em pastilhas de KBr.

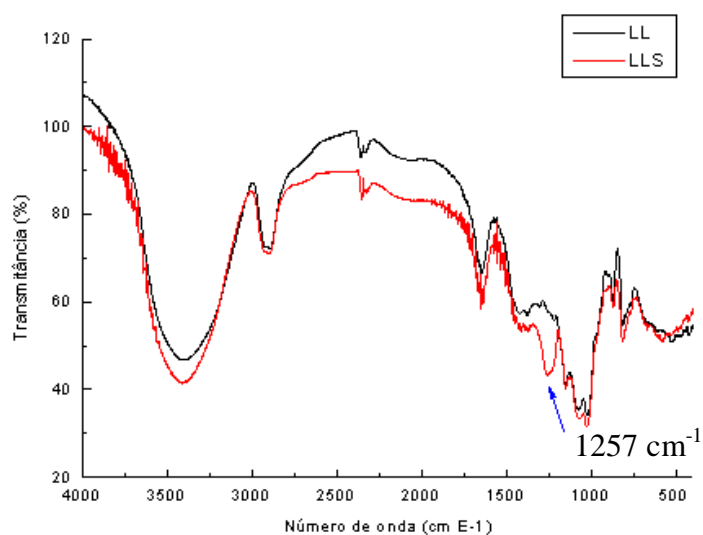


Figura 28: Espectros de infravermelho da galactomanana nativa (LL) e sulfatada (LLS) de sementes de *L. leucocephala* em pastilhas de KBr.

Nas análises por HPSEC-MALLS, foram obtidos perfis de eluição (Figuras 29-32, p. 61-63) com um pico principal homogêneo para índice de refração (azul) e para espalhamento de luz (vermelho). Os dois derivados mostraram massas molares ponderais médias (M_w) semelhantes: 620 kDa (BRS, dn/dc : $0,109 \text{ mL.g}^{-1}$) e 574 kDa (LLS, dn/dc : $0,123 \text{ mL.g}^{-1}$). Os valores de massa molar obtidos para os polissacarídeos nativos - M_w : 676 kDa (BR, dn/dc : $0,141 \text{ mL.g}^{-1}$) e 985 kDa (LL, dn/dc : $0,139 \text{ mL.g}^{-1}$) – indicam possível desagregação molecular ou mesmo degradação durante a síntese dos derivados. A análise do perfis de eluição que mostram que há uma diminuição no sinal do espalhamento de luz nos derivados sulfatados com relação aos polissacarídeos nativos.

A galactomanana nativa de *M. scabrella* apresenta relação Man:Gal de 1,1:1, enquanto a de *L. leucocephala* apresenta relação de 1,4:1. A obtenção de derivados com graus de derivatização e massas molares semelhantes permitiria, portanto, a análise da influência do grau de ramificação e posição de substituição dos grupamentos sulfatos no estudo de relação estrutura química/atividade antiviral proposto no presente trabalho.

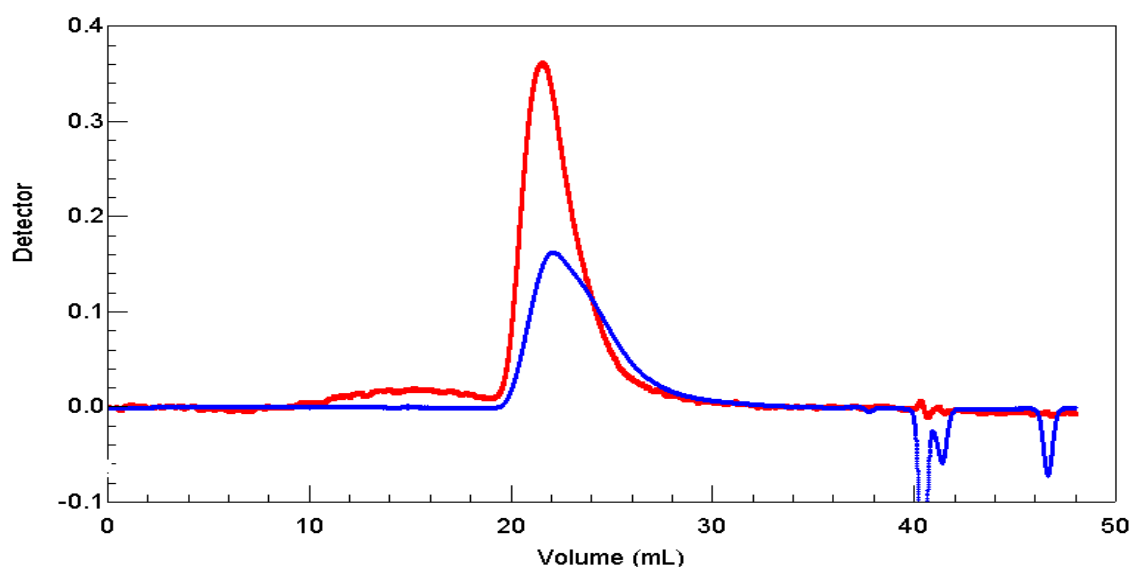


Figura 29: Perfil de eluição de BR analisado por HPSEC-MALLS (1 mg.mL^{-1} em NaNO_2 $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ contendo $0,02\%$ de NaN_3 a 25°C ; detecção por índice de refração em azul e por espalhamento de luz em vermelho).

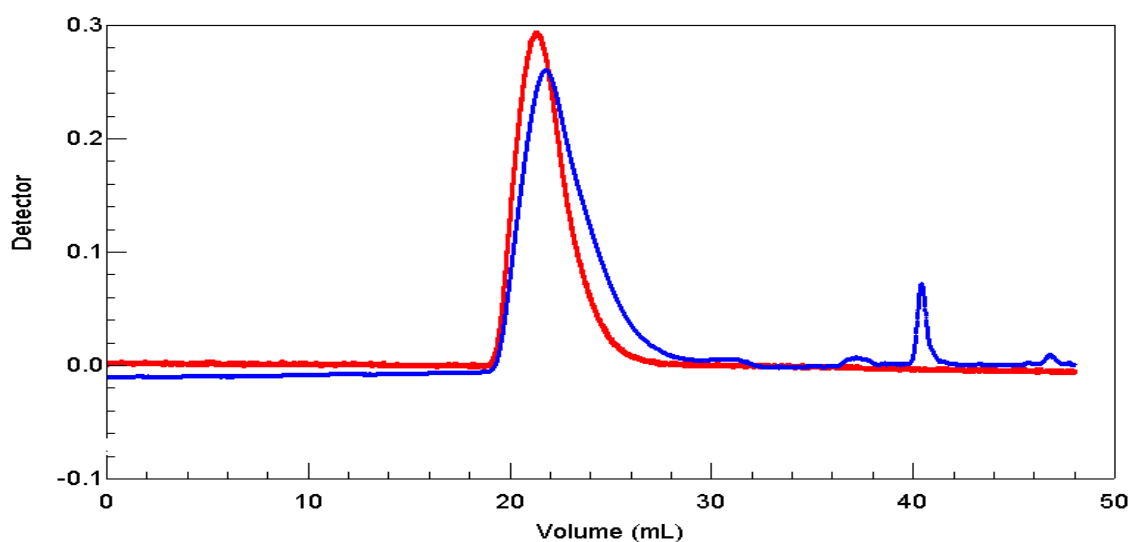


Figura 30: Perfil de eluição de BRS analisado por HPSEC-MALLS ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em NaNO_2 $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo $0,02\%$ de NaN_3 a 25°C ; detecção por índice de refração em azul e por espalhamento de luz em vermelho).

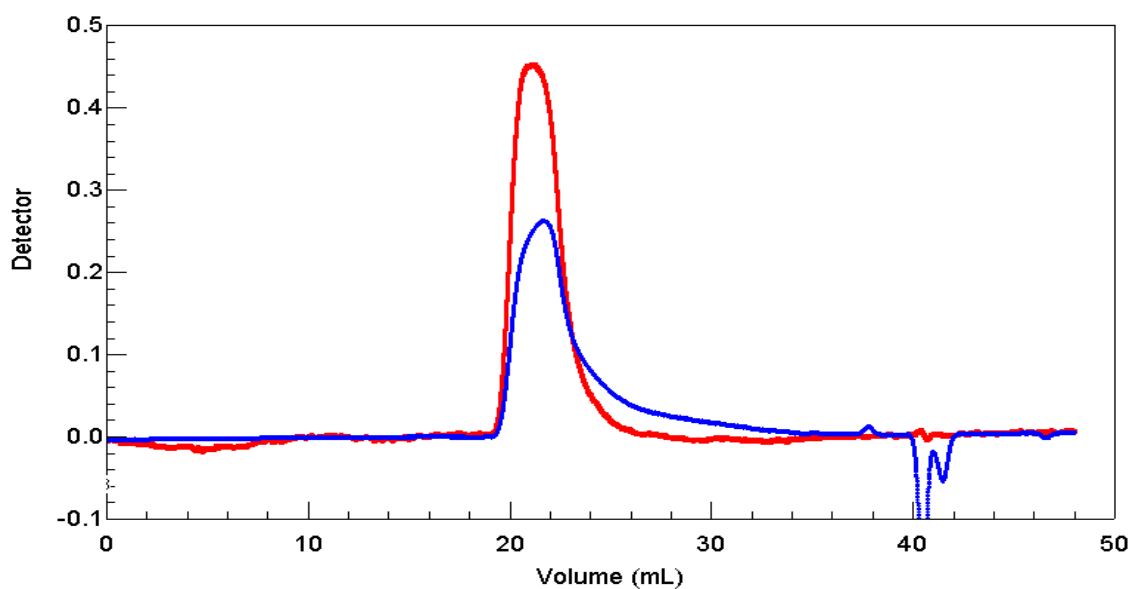


Figura 31: Perfil de eluição de LL analisado por HPSEC-MALLS ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em NaNO_2 $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo $0,02\%$ de NaN_3 a 25°C ; detecção por índice de refração em azul e por espalhamento de luz em vermelho).

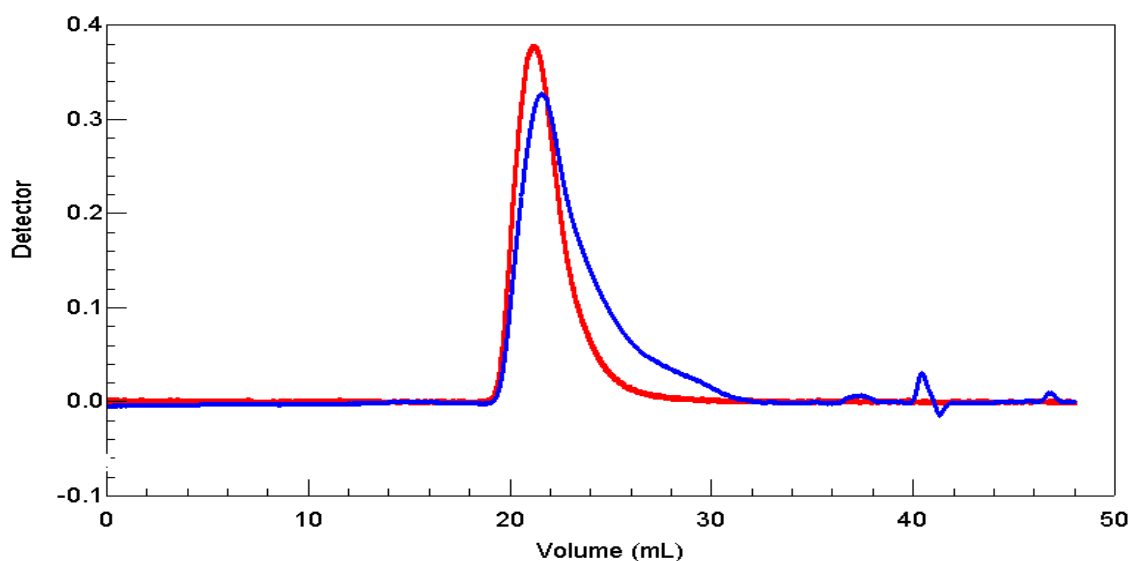


Figura 32: Perfil de eluição de LLS analisado por HPSEC-MALLS (1 mg.mL^{-1} em NaNO_2 $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ contendo $0,02\%$ de NaN_3 a 25°C ; detecção por índice de refração em azul e por espalhamento de luz em vermelho).

4.5 Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* em células C6/36:

O método do MTT se baseia na conversão do sal de tetrazólio (brometo de 3-(4',5'-dimetil-tiazol-2-il)-2,4-difeniltetrazólio (MTT), amarelo, a formazam, azul escuro, pelas células vivas. A análise dos dados das Tabelas 11 e 12 (p. 64) (resultados para 8 dias de incubação na presença do polissacarídeo) mostram que a dose citotóxica 50% (DC50) de BR e de LL sobre células C6/36 está situada acima de 8 mg.mL^{-1} (uma vez que, 8 mg.mL^{-1} foi a concentração máxima testada); a DC50 para BRS é de $1,21 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a de LLS é de $1,96 \text{ mg.mL}^{-1}$. Para que os derivados sulfatados pudessem ser avaliados quanto à ação, seria necessário que apresentassem atividade antiviral a uma dose inferior à DC50 observada nos experimentos de determinação da toxicidade.

Tabela 11: Avaliação da toxicidade *in vitro* de galactomananas nativa e sulfatada de sementes de *M. scabrella* sobre células C6/36 pelo método do MTT:

Redução do número de células viáveis em relação ao controle sem polissacarídeo (%)											
BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	BR6	BRS1	BRS2	BRS3	BRS4	BRS5	BRS6
32,9	ENS	ENS	ENS	ENS	ENS	76,1	70,1	62,1	52,1	ENS	ENS

- Os índices que acompanham as siglas BR e BRS indicam a concentração de polissacarídeo testada: 1) 8,0, 2) 4,0, 3) 2,0, 4) 1,0, 5) 0,5, 6) 0,25; as concentrações são expressas em mg.mL⁻¹;

- ENS: diferença estatisticamente não significativa com relação à absorbância obtida para o controle sem polissacarídeo, analisada pelo teste t, nível de significância de 0,02.

Tabela 12: Avaliação da toxicidade *in vitro* de galactomananas nativa e sulfatada de sementes de *L. leucocephala* sobre células C6/36 pelo método do MTT:

Redução do número de células viáveis em relação ao controle sem polissacarídeo (%)											
LL1	LL2	LL3	LL4	LL5	LL6	LLS1	LLS2	LLS3	LLS4	LLS5	LLS6
19,6	19,0	18,0	ENS	ENS	ENS	75,9	61,6	44,3	39,1	24,6	ENS

- Os índices que acompanham as siglas LL e LLS indicam a concentração de polissacarídeo testada, como descrito na Tabela 11.

4.6 Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* contra YFV (BeH111) e DEN-1 (Hawaii) *in vitro*:

Nesse primeiro teste de atividade antiviral *in vitro*, que leva em conta o número de poços com ou sem imunofluorescência, e a concentração inibitória 50% (CI50) sendo calculada pelo método de Reed e Muench (DULBECCO; GINSBERG, 1980^b), pôde-se verificar pela Figura 33 (p. 65) que as galactomananas BR e BRS não apresentaram atividade contra o vírus da febre amarela (cepa BeH111). Porém, o que se observou na prática, é que mesmo com 100% de poços fluorescentes (positivos para a presença do antígeno viral), a proporção de células fluorescentes foi menor nos poços em que houve adição simultânea de BRS ao vírus durante a adsorção, porém, essa diferença não foi quantificável por essa

metodologia. Já a galactomanana sulfatada LLS apresentou uma CI50 de 30 $\mu\text{g} \cdot \text{poço}^{-1}$ (Figura 34).

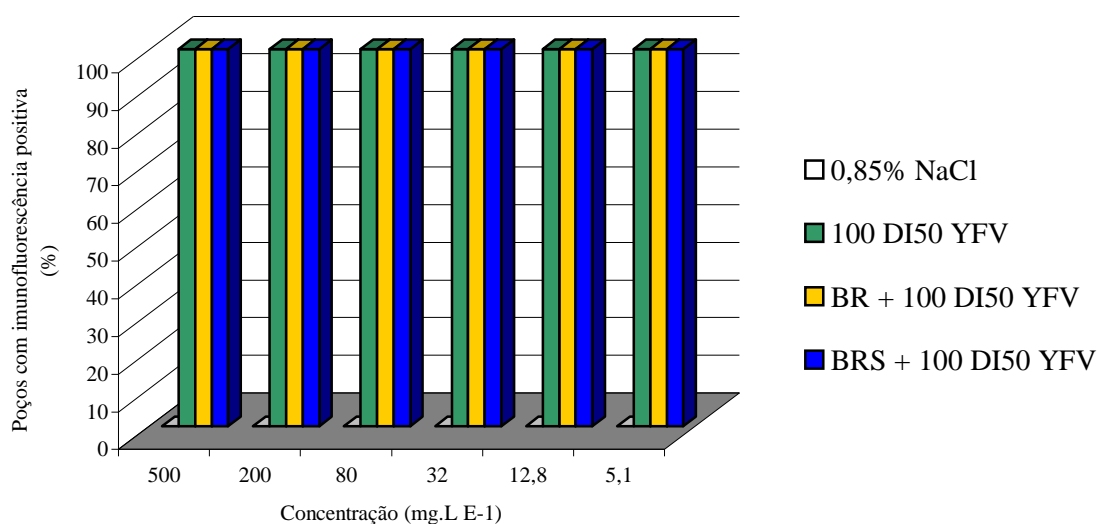


Figura 33: Determinação da atividade antiviral in vitro (contra o YFV – cepa BeH111) de galactomananas nativa e sulfatada de *M. scabrella* sobre células C6/36 em placas de 24 poços por imunofluorescência (8 dias de incubação em estufa de CO₂ 5% a 28°C).

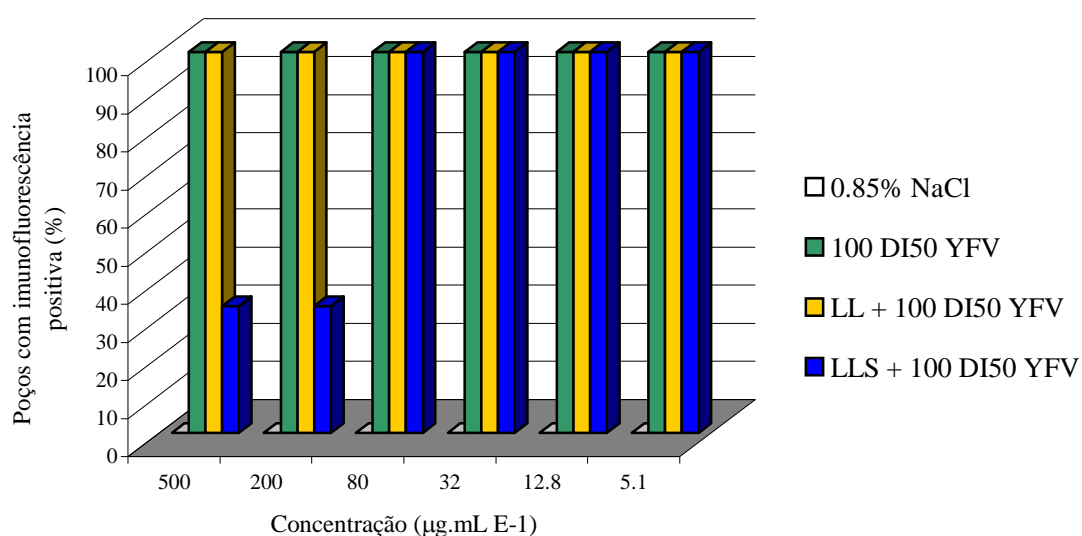


Figura 34: Determinação da atividade antiviral in vitro (contra o YFV – cepa BeH111) de galactomananas nativa e sulfatada de *L. leucocephala* sobre células C6/36 em placas de 24 poços por imunofluorescência (8 dias de incubação em estufa de CO₂ 5% a 28°C).

Na tentativa de se obter uma resposta quantitativa de atividade antiviral, empregou-se uma segunda metodologia, infectando-se garrafas T25 (Corning) com vírus (febre amarela - BeH111 ou dengue 1) isolado a 100 DI50 ou vírus na presença de polissacarídeo e determinando o título viral de cada garrafa após 8 dias de incubação. A construção de curvas de regressão linear de concentração de polissacarídeo x logaritmo do título determinado através dos dados das Tabelas 13 e 14 (p. 67) (Figura 35, p. 67) permitiu a determinação da concentração capaz de reduzir em 100 vezes o título viral determinado nos controles positivos. As curvas de regressão foram obtidas com a titulação do sobrenadante de apenas 1 garrafa por concentração e por isso mostram apenas uma tendência de redução do título viral em função do aumento da concentração dos derivados sulfatados (provavelmente esse comportamento não seria linear). Para o dengue 1, essas concentrações foram de 347 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BRS) e de 37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LLS) e para o vírus da febre amarela selvagem foram de 1055 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BRS) e de 386 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LLS). Para ambos os vírus, obteve-se melhor resposta com o derivado LLS, de *L. leucocephala*. Nesse experimento *in vitro*, os derivados sulfatados apresentaram melhor resposta contra o vírus dengue 1.

Tabela 13: Avaliação da atividade antiviral *in vitro* (contra o YFV – cepa BeH111) de galactomananas nativa e sulfatada de sementes de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* sobre células C6/36 em garrafas T25 por determinação do título viral:

Log ₁₀ do título viral determinado (valor absoluto)													
C. pos.	BR1	BRS1	BRS2	BRS3	BRS4	BRS5	LL1	LLS1	LLS2	LLS3	LLS4	LLS5	
	5,5	5,6	3,8	4,6	5,6	5,6	5,3	5,8	2,6	4,4	6,2	5,5	6,4

- C. pos.: controle positivo, com inoculação de vírus a 100 DI50;

- Inoculação simultânea de vírus a 100 DI50 e polissacarídeo em diferentes concentrações;

- Os índices que acompanham as siglas indicam a quantidade de polissacarídeo inoculada por garrafa T25: 1) 900 μg (solução a 0,5 mg.mL^{-1}); 2) 450 μg (0,25 mg.mL^{-1}); 3) 225 μg (0,125 mg.mL^{-1}); 4) 112,5 μg (0,0625 mg.mL^{-1}); 5) 56,2 μg (0,0312 mg.mL^{-1}).

Tabela 14: Avaliação da atividade antiviral *in vitro* (contra o DEN-1 – cepa Hawaii) de galactomananas nativa e sulfatada de sementes de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* sobre células C6/36 em garrafas T25 por determinação do título viral:

C. pos.	Log ₁₀ do título viral determinado (valor absoluto)									
	BR1	BRS1	BRS2	BRS3	BRS4	LL1	LLS1	LLS2	LLS3	LLS4
7,1	6,7	3,8	5,8	7,2	7,4	6,8	2,7	3,8	4,2	5,4

- C. pos.: controle positivo, com inoculação de vírus a 100 DI50;

- Inoculação simultânea de vírus a 100 DI50 e polissacarídeo em diferentes concentrações;

- Os índices que acompanham as siglas indicam a quantidade de polissacarídeo inoculada por garrafa T25: 1) 900 µg (solução a 0,5 mg.mL⁻¹); 2) 450 µg (0,25 mg.mL⁻¹); 3) 225 µg (0,125 mg.mL⁻¹); 4) 112,5 µg (0,0625 mg.mL⁻¹).

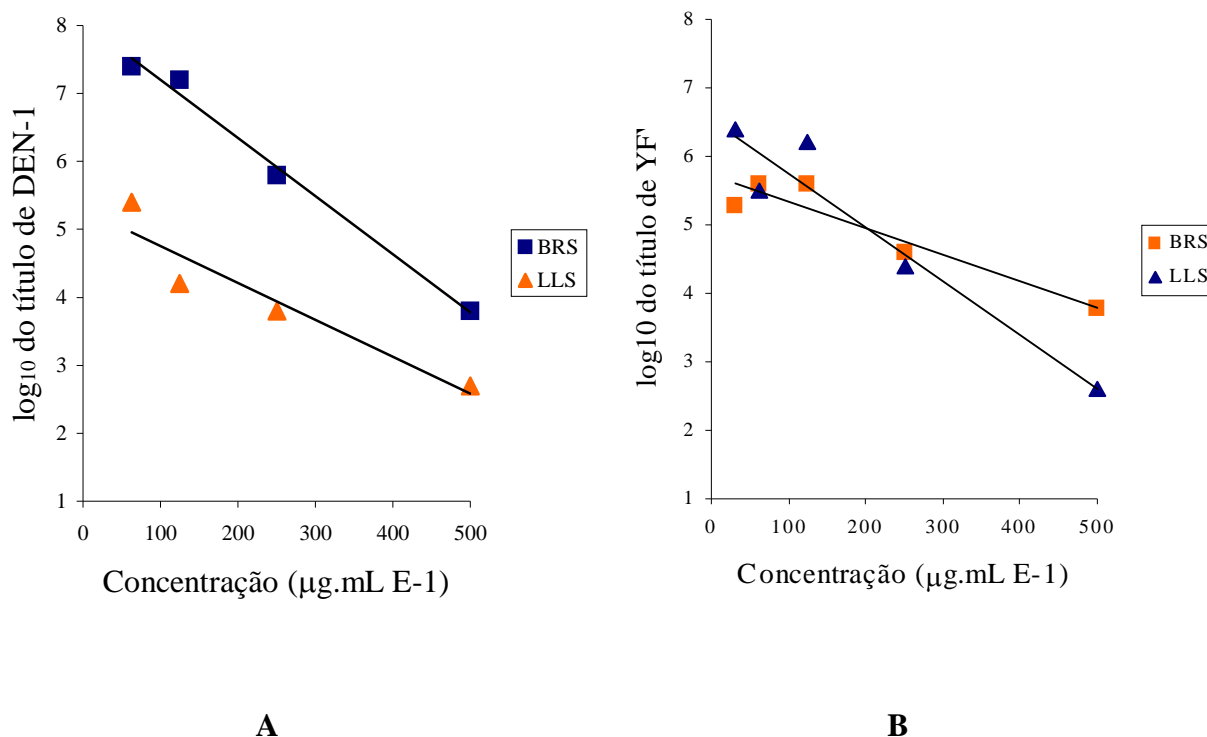


Figura 35: Títulos virais de DEN-1 (A) e YFV (B) em função da concentração dos derivados, determinados através de titulação do sobrenadante das garrafas T25 (tratadas simultaneamente com vírus e galactomananas sulfatadas BRS ou LLS) por imunofluorescência em placas de 24 poços (8 dias de incubação em estufa de CO₂ (5%) a 28°C).

Diversos polissacarídeos sulfatados inibem a replicação de vírus como o HIV-1, HSV-1 e CMV com CI50 entre 0,1 – 13,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (WITVROUW; de CLERCQ, 1997). O alto valor de CI50 obtido para LLS parece não estar de acordo com um possível mecanismo de ação que envolva a inibição da etapa de adsorção viral. Por outro lado, NEYTS *et al.* (1996) verificaram que a dextrana sulfatada (M_w : 10^4) previne o efeito citopático induzido pelo YFV (cepa 17D) sobre células VERO a uma CI50 de 27 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, que poderia ser comparado ao valor obtido para LLS (CI50: 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), se for levado em consideração que, no estudo de NEYTS *et al.* (1996), as células foram infectadas com 10 DI50 (10 vezes menor que a empregada neste trabalho). Alguns autores relatam que polissacarídeos ácidos podem exercer ação virucida contra o HSV-1 e o HSV-2 (CARLUCCI *et al.*, 1999; EO *et al.*, 2000). Os derivados sulfatados LLS e BRS não foram avaliados quanto a essa atividade.

4.7 Determinação da toxicidade das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* in vivo:

As galactomananas nativas ou sulfatadas de *M. scabrella* (BR e BRS) e de *L. leucocephala* (LL e LLS) foram administradas pela via intracerebral (20 μL) em camundongos recém-nascidos de 2-3 dias (n: 6), nas concentrações de 31 a 8000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (em um total de 9 concentrações diferentes) e não levaram à morte de animais em qualquer uma das concentrações, assim como o controle negativo inoculado com solução de NaCl 0,85%.

Para a determinação de toxicidade em camundongos, fêmeas jovens adultas de 25-30 dias (n: 6), foram inoculadas pela via intraperitoneal com soluções de polissacarídeos entre 0,6 e 5,0 mg.mL^{-1} (em um total de 7 administrações), sendo pesadas diariamente para comparação da porcentagem de ganho de massa com relação à massa inicial (Tabela 15, p. 69 e Tabela 16, p. 71, Figuras 36-37, p. 70, Figuras 38-39, p. 72). Após 14 dias de observação (as pesagens dos animais foram realizadas até o 11^o dia), não houve morte dos animais em todas as concentrações testadas de BR, BRS, LL e LLS. A comparação do ganho de massa média dos grupos com relação ao grupo controle inoculado com salina mostrou diferença estatisticamente significativa (menor ganho de massa e mesmo diminuição com relação à massa inicial) para as fêmeas inoculadas com a galactomanana nativa (LL1) e sulfatada (LLS1, LLS2, LLS3, LLS4 e LLS5) de *L. leucocephala*, principalmente durante as primeiras

administrações, porém, recuperando o ganho de massa normal até a 7ª aplicação (Tabela 16, p. 71). O motivo pelo qual LL e LLS poderiam diminuir o ganho de massa normal em camundongos durante as primeiras inoculações não está esclarecido, uma vez que a presença do aminoácido não-proteico mimosina (presente em folhas e sementes de *L. leucocephala* e conhecidamente tóxico) seria improvável após a extração do polissacarídeo por precipitação e lavagem com etanol. O gráfico interno da Figura 39 (p. 72), que analisa a porcentagem de perda de massa dos animais inoculados com LLS em relação ao controle inoculado com salina no 1º, 3º e 7º dias de administração, mostra que há uma menor perda de massa com o decorrer das administrações. No primeiro dia, a dose necessária para reduzir o ganho normal em 50% foi de 8,9 mg.kg⁻¹, no terceiro, de 43,6 mg.kg⁻¹ e no sétimo, de 168,1 mg.kg⁻¹.

Tabela 15: Determinação da porcentagem de ganho de massa média em camundongos fêmeas jovens adultas com relação à massa média inicial durante a administração de solução de polissacarídeo de sementes de *M. scabrella* por via intraperitoneal:

	Ganho de massa média do grupo com relação à massa inicial (%) (desvio padrão)										
	C NEG.	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	BRS1	BRS2	BRS3	BRS4	BRS5
Dia 1	9,9 (4,5)	5,4 (2,8)	8,5 (3,2)	9,1 (2,5)	9,8 (2,9)	8,9 (2,2)	4,8 (3,4)	7,0 (2,5)	6,8 (3,4)	9,9 (2,2)	7,2 (2,8)
Dia 3	21,3 (2,6)	17,6 (4,2)	21,1 (4,8)	19,4 (4,7)	20,9 (4,4)	21,3 (4,2)	17,1 (3,7)	23,7 (5,9)	20,8 (1,6)	23,3 (3,9)	17,7 (2,0)
Dia 7	51,1 (4,7)	43,6 (6,5)	49,2 (7,2)	45,0 (6,8)	45,4 (4,6)	46,8 (5,2)	42,3 (6,4)	51,2 (6,0)	44,7 (5,1)	49,2 (4,7)	43,4 (6,1)
Dia 8	54,0 (4,6)	48,2 (7,7)	55,7 (9,6)	47,2 (4,5)	52,2 (9,6)	52,5 (4,5)	46,6 (6,4)	55,8 (6,0)	51,0 (5,1)	52,7 (4,7)	47,1 (6,1)
Dia 9	57,1 (7,2)	52,3 (6,7)	59,4 (8,8)	51,9 (7,0)	56,0 (8,5)	55,8 (3,3)	52,0 (7,9)	61,1 (8,9)	55,8 (5,4)	57,8 (5,9)	50,9 (8,9)
Dia 10	63,4 (7,0)	55,6 (9,4)	63,6 (10,1)	57,2 (7,0)	57,0 (8,8)	63,0 (4,0)	55,5 (7,2)	67,9 (9,1)	61,1 (5,8)	59,8 (5,8)	54,2 (11,3)
Dia 11	62,1 (7,4)	55,8 (8,0)	65,7 (10,6)	60,5 (8,7)	61,7 (10,0)	65,9 (3,5)	57,0 (7,5)	67,7 (10,7)	60,4 (3,4)	63,8 (6,9)	56,8 (10,6)

- C NEG.: controle negativo, inoculado com solução de NaCl 0,85% nos dias 0, 1, 3, 7, 8, 9, 10 e observados até o 14º dia para verificação de morte, como realizado para os demais grupos com inoculação de polissacarídeo;

- Os índices que acompanham as siglas BR e BRS indicam a dose administrada (mg.kg⁻¹) de polissacarídeo: 1) 244 (solução a 5 mg.mL⁻¹); 2) 144 (2,94 mg.mL⁻¹); 3) 84 (1,73 mg.mL⁻¹); 4) 50 (1,02 mg.mL⁻¹); 5) 29 (0,60 mg.mL⁻¹).

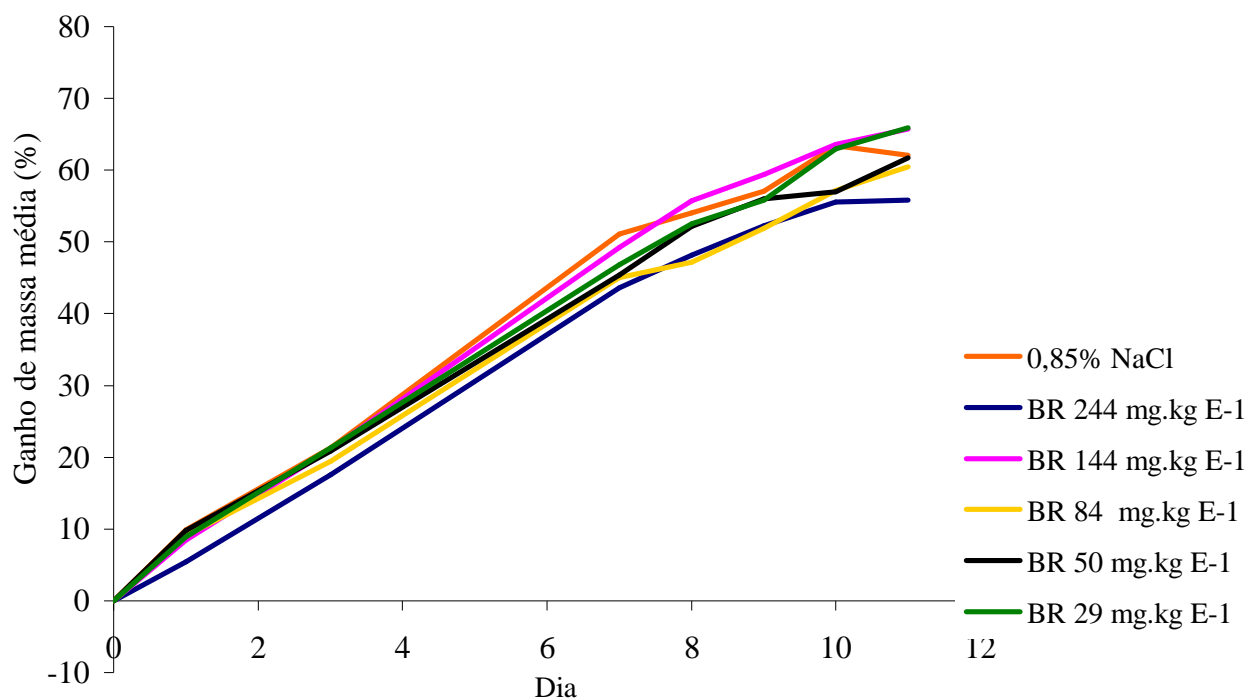


Figura 36: Curvas de ganho de massa (massa inicial: 17-21 g, n: 6) após administração intraperitoneal de BR (total de 7 doses, volume administrado: 1 mL) em camundongos fêmeas de 25-30 dias.

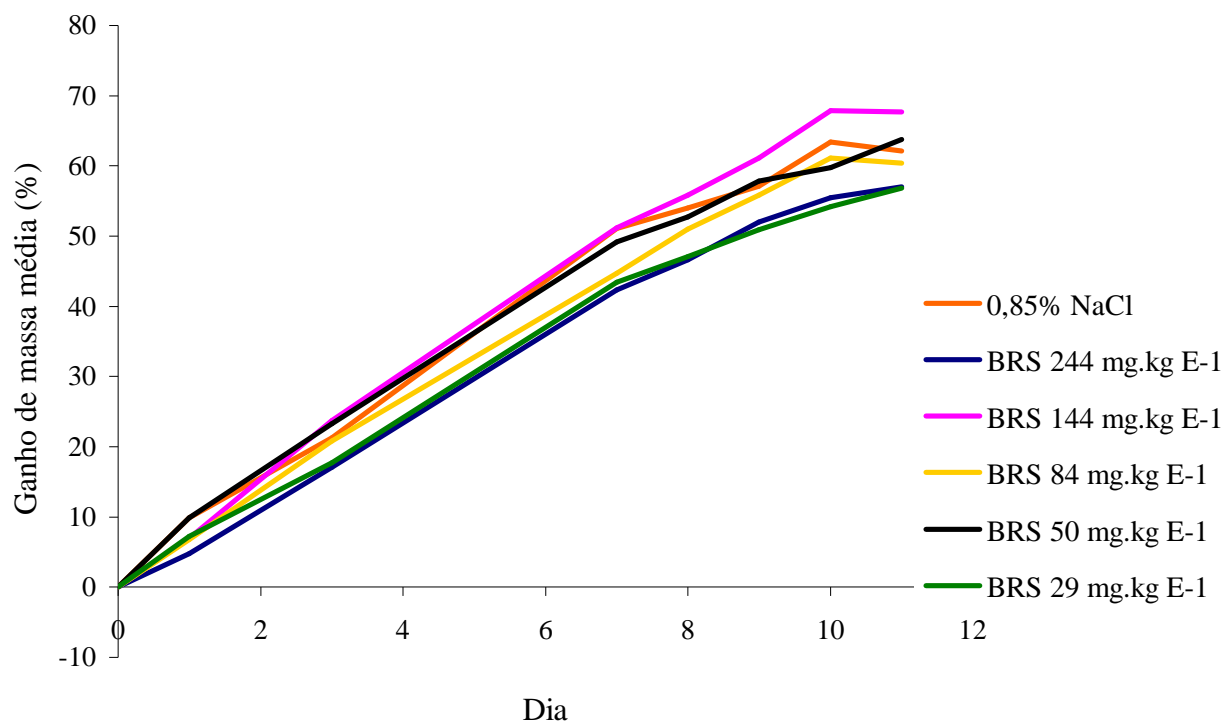


Figura 37: Curvas de ganho de massa (massa inicial: 17-21 g, n: 6) após administração intraperitoneal de BRS (total de 7 doses, volume administrado: 1 mL) em camundongos fêmeas de 25-30 dias.

Tabela 16: Determinação da porcentagem de ganho de massa média em camundongos fêmeas jovens adultas com relação à massa inicial durante a administração de solução de polissacarídeo de sementes de *L. leucocephala* por via intraperitoneal:

	Ganho de massa média do grupo com relação à massa inicial (%) (desvio padrão)										
	C NEG.	LL1	LL2	LL3	LL4	LL5	LLS1	LLS2	LLS3	LLS4	LLS5
Dia 1	9,9 (4,5)	4,8 (2,3)	8,4 (3,7)	8,3 (4,2)	7,4 (3,9)	7,8 (4,2)	-4,2*b (2,2)	-4,1*e (2,3)	-1,4*j (1,2)	-0,3*l (3,5)	3,2*p (1,9)
Dia 3	21,3 (2,6)	18,1 (5,3)	20,7 (4,3)	22,5 (6,2)	22,3 (4,4)	18,2 (3,6)	3,0*c (9,7)	10,8*f (2,5)	12,9*k (5,2)	14,6*m (4,0)	14,0*q (5,6)
Dia 7	51,1 (4,7)	37,5*a (10,1)	46,7 (6,9)	42,9 (12,9)	45,0 (8,4)	40,1 (8,9)	26,0*d (17,7)	39,4*g (6,5)	41,9 (7,0)	36,5*n (8,0)	44,5 (5,1)
Dia 8	54,0 (4,6)	42,8 (10,1)	51,7 (6,9)	50,5 (12,9)	52,8 (8,4)	43,6 (8,9)	37,2 (17,7)	43,3*h (6,5)	46,8 (7,0)	43,6*o (8,0)	52,0 (5,1)
Dia 9	57,1 (7,2)	46,6 (14,2)	55,2 (9,5)	53,8 (14,2)	55,0 (12,9)	45,3 (9,9)	41,2 (20,8)	49,3 (7,4)	52,4 (6,9)	48,2 (7,5)	58,3 (4,9)
Dia 10	63,4 (7,0)	51,2 (14,0)	57,8 (8,2)	56,0 (13,6)	56,8 (15,3)	48,9 (11,1)	47,8 (17,2)	50,4*i (8,3)	58,4 (7,8)	50,8 (8,9)	63,1 (6,5)
Dia 11	62,1 (7,4)	52,3 (14,9)	59,2 (6,7)	58,6 (14,4)	60,2 (17,1)	51,0 (10,5)	52,0 (15,7)	54,2 (10,3)	61,8 (6,7)	53,4 (9,2)	69,2 (7,5)

- C NEG.: como descrito na Tabela 15;

- Os índices que acompanham as siglas LL e LLS indicam a dose administrada de polissacarídeo, como descrito na Tabela 15;

*Diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle, determinado pelo teste t, com nível de significância de 0,02 e n: 6 para cada grupo. As porcentagens de ganho de massa menor que o do grupo controle foram de: a) 26,6%; b) 142,0%; c) 85,7%; d) 49,0%; e) 140,9%; f) 49,0%; g) 22,9%; h) 19,8%; i) 20,5%; j) 114,3%; k) 39,3%; l) 103,0%; m) 31,1%; n) 28,6%; o) 19,3%; p) 67,8%; q) 34,0%.

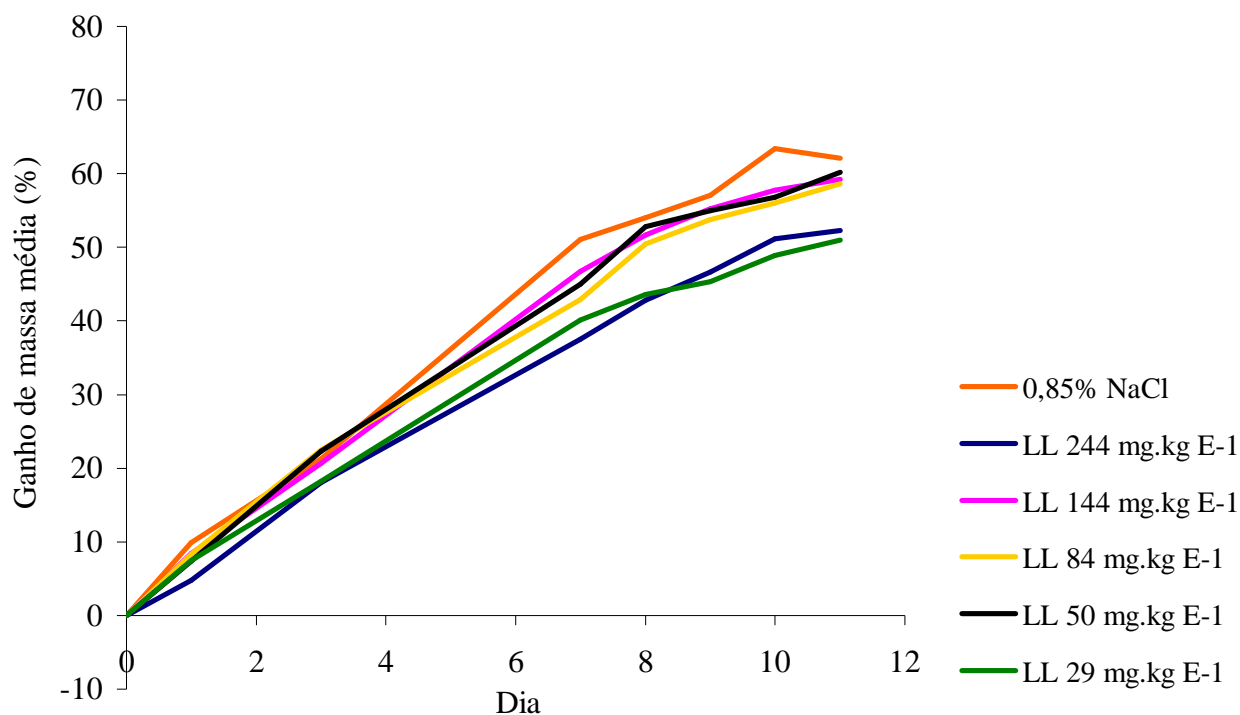


Figura 38: Curvas de ganho de massa (massa inicial: 17-21 g, n: 6) após administração intraperitoneal de LL (total de 7 doses, volume administrado: 1 mL) em camundongos fêmeas de 25-30 dias.

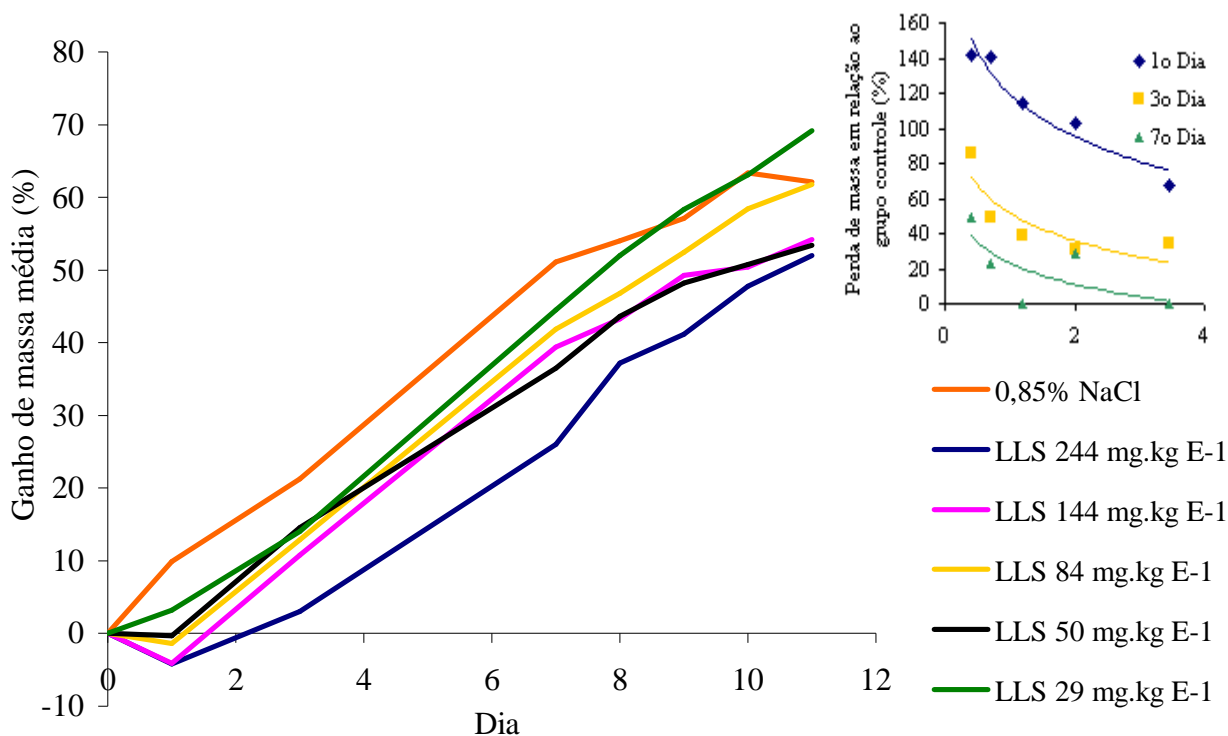


Figura 39: Curvas de ganho de massa (massa inicial: 17-21 g, n: 6) após administração intraperitoneal de LLS (total de 7 doses, volume administrado: 1 mL) em camundongos fêmeas de 25-30 dias. Gráfico interno: curvas de perda de peso no 1º, 3º e 7º dias para diferentes concentrações de LLS.

O estudo de toxicidade em camundongos jovens adultos mostra, portanto, que, abaixo de 5 mg.mL^{-1} (244 mg.kg^{-1}), BRS e LLS não foram letalmente tóxicos. SMEE *et al.* (1996) observaram uma perda de massa em camundongos tratados intraperitonealmente com goma tragacanta a 200 mg.kg^{-1} . Outros estudos com administração intravenosa de dextrana sulfatada (FLEXNER *et al.*, 1991) e xilana sulfatada (LUSH *et al.*, 1996) em pacientes com HIV mostraram trombocitopenia profunda porém reversível e anormalidades hepáticas, indicando as possíveis vias de toxicidade de polissacarídeos sulfatados *in vivo*.

4.8 Teste de atividade antiviral das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala* contra YFV (BeH111) e DEN-1 (Hawaii) *in vivo*:

As galactomananas nativas (BR e LL) e sulfatadas (BRS e LLS) não apresentaram atividade antiviral frente aos vírus da febre amarela selvagem, dengue 1 e dengue 2 em camundongos recém-nascidos abaixo de $500 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, inoculando-se $20 \text{ } \mu\text{L}$ de uma mistura polissacarídeo e vírus (100 DL50) por via intracerebral, uma vez que todos os animais morreram apresentando sintomas de doença por encefalite (paralisia de patas) até o término de 14 dias de observação, como verificado para o controle positivo (suspensão viral sem polissacarídeo). O controle negativo (solução de NaCl 0,85%) apresentou todos os animais vivos.

O teste de atividade antiviral realizado em camundongos fêmeas jovens adultas inoculando-se vírus pela via intraperitoneal a uma diluição capaz de matar 100% dos animais, como verificado pelo controle positivo (Tabela 17, Figura 40, p. 74), mostrou que os derivados sulfatados BRS e LLS apresentaram efeito protetor contra o desenvolvimento de sintomas e morte por febre amarela quando inoculados simultaneamente com o vírus selvagem (cepa BeH111) a uma concentração de 1 mg.mL^{-1} (com uma dose equivalente a 49 mg.kg^{-1}). A galactomanana sulfatada LLS apresentou proteção média de 96,5%, enquanto BRS apresentou 87,8%. De modo bastante interessante, o animal que apresentou-se doente no grupo 2 do teste com LLS, desenvolveu paralisia da pata traseira esquerda apenas e foi mantido sob observação durante 3,5 meses, período após o qual foi sacrificado, indicando que a doença não progrediu nesse animal, deixou seqüela, porém foi limitada. Não houve observação semelhante nos grupos controles positivos, em que uma vez iniciados os sintomas,

havia progressão da doença até a morte. No Instituto Adolfo Lutz –SP, onde os experimentos *in vivo* foram realizados, também não há relatos de estacionamento da doença em animais com permanência de seqüela; os animais paralíticos doentes sempre progrediram até a morte.

Tabela 17: Avaliação da atividade antiviral em camundongos fêmeas jovens adultas contra o vírus da febre amarela (cepa BeH111) por via intraperitoneal:

	Número de animais mortos (+) ou doentes (D)				
	C. neg. BRS	C. neg. LLS	C. positivo	Teste BRS	Teste LLS
Grupo 1	0	0	19+	4+	1+
Grupo 2	—	—	19+	3+	1D
Grupo 3	—	—	19+	0	0

- C. neg.: controle negativo, inoculado com galactomana sulfatada em solução de NaCl 0,85% e observados até o 14º dia para verificação de morte, como realizado para os demais grupos;

- C. Positivo: inoculação de vírus a 25 DL50;

- Teste: com inoculação simultânea de vírus a 25 DL50 e polissacarídeo a 1 mg.mL⁻¹.

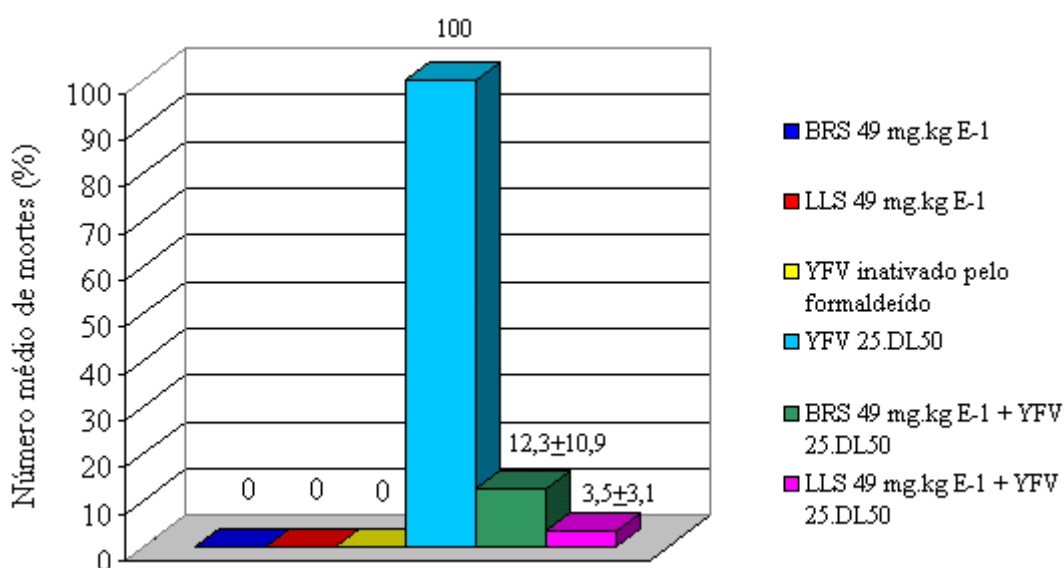


Figura 40: Atividade antiviral *in vivo* de BRS e LLS a uma dose de 49 mg.kg⁻¹ (massa do camundongo: 17-21 g, n: 3 grupos de 19 animais) avaliada pela via intraperitoneal (volume inoculado: 1 mL, tempo de observação: 14 dias).

Quando as galactomananas sulfatadas foram inoculadas em jovens adultas (n: 6) no 3º e 4º dias após a inoculação da suspensão viral (febre amarela – BeH111, 25 DL50), período

em que os animais ainda não haviam desenvolvido a doença, porém começavam a ficar questionados com relação ao aparecimento dos sintomas, não houve proteção utilizando-se dose de 49 mg.kg^{-1} de massa animal. O controle positivo (inoculação de suspensão viral apenas), o grupo teste BRS (tratamento com BRS) e o grupo teste LLS (tratamento com LLS) apresentaram 100% de morte, enquanto o controle negativo (inoculação de solução salina) apresentou 100% de animais vivos. A inoculação dos polissacarídeos não retardou o início e nem a progressão normal da doença.

Embora tenha sido observado um alto efeito protetor de BRS e LLS em jovens adultas (com inoculação simultânea com o vírus da febre amarela), não houve reprodução desse efeito em modelo utilizando camundongos recém-nascidos frente aos vírus da febre amarela selvagem, dengue 1 e dengue 2 (100 DL50, concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dose: 2 mg.kg^{-1}), modelo muito mais sensível à infecção devido à baixa resistência imune dos recém-nascidos. Camundongos jovens adultos são resistentes ao desenvolvimento de doença pela inoculação do vírus da dengue pela via intraperitoneal, razão pela qual não foram testados esses vírus nesse modelo. A concentração de teste utilizada para BRS e LLS em experimentos com jovens adultas foi de 1 mg.mL^{-1} , devido à facilidade de filtração dos polissacarídeos por membranas de $0,22 \mu\text{m}$ de poro para esterilização, concentrações superiores a 1 mg.mL^{-1} foram obtidas por autoclavação a 121°C por 15 minutos. A solução de NaCl 0,85% apresentou pH 5-6 após autoclavação. As soluções de polissacarídeos autoclavadas a uma concentração de 10 mg.mL^{-1} apresentaram após autoclavação pH 5-6 (BR, LL, LLS) e pH 4-5 (BRS). A Tabela 16 (p. 71), com os dados de ganho médio de massa dos animais inoculados com LLS indicam que mesmo a 1 mg.mL^{-1} , os animais ganham menos massa que o ganho normal verificado para o grupo controle sem polissacarídeo, porém não foram registradas mortes, optando-se então por testar essa concentração.

As amostras BR e LL, de galactomananas nativas, quando testadas quanto à atividade antiviral contra YFV em camundongos fêmeas jovens adultas (n: 6) (via intraperitoneal, inoculação simultânea de vírus e solução de polissacarídeo), nas concentrações de 5 e 1 mg.mL^{-1} , não apresentaram efeito protetor, com morte de todos os animais entre seis e nove dias de inoculação com desenvolvimento de sintomas.

Camundongos neonatos são bastante susceptíveis à replicação viral através de inoculação intracerebral, devido ao tropismo viral a esses tecidos. Camundongos de 2-3 dias apresentam sistema imune imaturo (MOREIN *et al.*, 2002), portanto, a possibilidade de atividade imunoestimulatória de BRS e LLS deve ser levada em consideração. Outros polissacarídeos como os isolados de *Angelica gigas* (HAN *et al.*, 1998), *Centrosema*

pubescens (SILVA; TOSTES; PARENTE, 2000) e *Orbignyia phalerata* (SILVA; PARENTE, 2001) apresentaram atividades imunomodulatórias. A administração intraperitoneal do polissacarídeo de *A. gigas* a uma dose de 30 mg.kg⁻¹ em camundongos, após a imunização com glóbulos vermelhos, causou um aumento de 3,2 vezes no número de células formadoras de anticorpos no baço. A uma dose de 50 mg.kg⁻¹, a arabinogalactana de *C. pubescens* aumentou a atividade fagocítica em camundongos.

A observação de baixos valores de CI50 *in vitro*, por exemplo para dextranas sulfatadas contra o HIV-1 (0,4 µg.mL⁻¹) e o HIV-2 (0,1 µg.mL⁻¹) (NEYTS *et al.*, 1995), não assegura uma resposta eficiente *in vivo*. Isto foi demonstrado pela administração de dextrana sulfatada por via intravenosa a pacientes com infecção sintomática pelo HIV durante 14 dias a doses 200 vezes maiores que as CI50 obtidas *in vitro*, porém mostrando-se ineficazes *in vivo* (FLEXNER *et al.*, 1991). Isto reforça o conceito de que a atividade antiviral de alguns polissacarídeos sulfatados *in vivo* não pode ser explicada tendo-se por base a inibição da adsorção do vírus a receptores na célula hospedeira, como parece ocorrer *in vitro*.

4.9 Realização de teste de desafio e determinação dos índices de neutralização contra o YFV (cepa BeH111) do soro de camundongos tratados simultaneamente com vírus e os derivados BRS e LLS:

Como já discutido, quando BRS e LLS foram inoculados simultaneamente à inoculação do vírus a uma dose de 49 mg.kg⁻¹, LLS mostrou proteção contra a morte de 96,5% e BRS de 87,7%.

Quando os grupos de animais sobreviventes desse experimento de atividade antiviral foram desafiados com uma nova inoculação de dose letal de YFV, houve sobrevivência de 100% dos animais previamente tratados com LLS + YFV e de 93,3% para BRS + YFV, assim como no grupo previamente tratado com YFV inativado por formaldeído (Figura 41, p. 77).

Os animais dos grupos testes desenvolveram anticorpos neutralizantes contra o YFV em títulos similares ao grupo inoculado com YFV inativado por formaldeído (Tabela 18, p. 77). A determinação da razão entre o título de neutralização dos soros dos grupos testes e do título de neutralização dos soros dos grupos controle negativos mostrou índices de neutralização de 3,3 para BRS e de 3,7 para LLS. Estes resultados parecem indicar que, de fato, a inibição da replicação viral por BRS e LLS, *in vivo*, pode estar acontecendo devido a

uma atividade imunoestimulatória, e não apenas devido à inibição da etapa de adsorção do vírus.

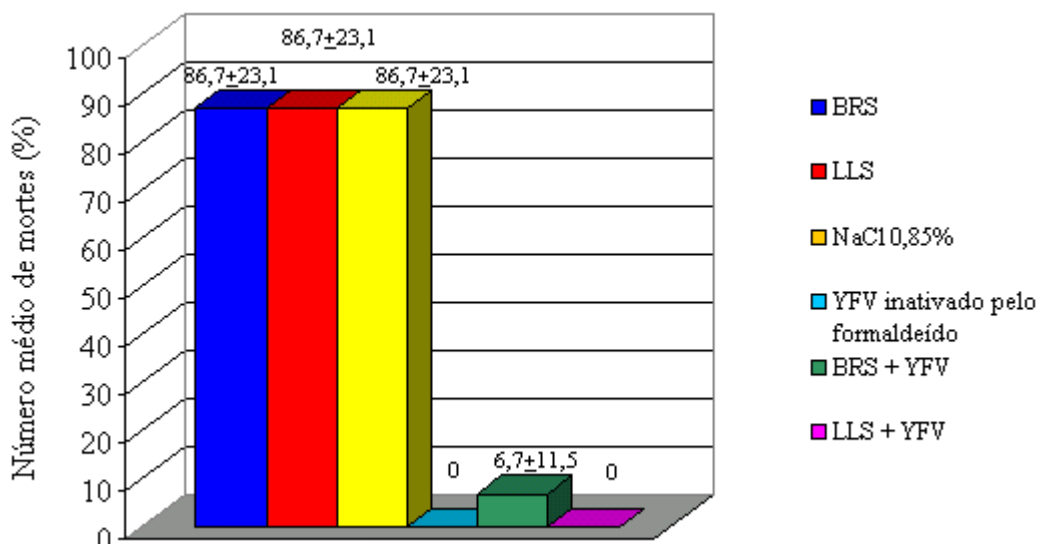


Figura 41: Experimento de desafio (n: 3 grupos de 5 animais) através de inoculação intraperitoneal de camundongos com YFV (37,5 DL50) (volume inoculado: 1 mL, tempo de observação: 50 dias).

Tabela 18: Títulos de neutralização de soros de camundongos pré-desafio contra YFV(BeH111):

Derivado	^a Título do soro controle negativo (DL50)	^b Título do soro YFV inativado com formaldeído (DL50)	^c Título do soro do grupo teste (DL50)	^d Índice de neutralização
BRS	$10^{-7.9}$	$10^{-5.5}$	$10^{-4.6}$	3.3
LLS	$10^{-9.4}$	$10^{-6.4}$	$10^{-5.7}$	3.7

^a Camundongos previamente inoculados apenas com o derivado (49 mg.kg^{-1}), ^b camundongos previamente inoculados com YFV inativado por formaldeído (25 DL50), ^c camundongos previamente inoculados com galactomanana sulfatada (49 mg.kg^{-1}) + YFV 25 DL50, ^d valores representando \log_{10} do índice de neutralização. Todos os soros foram coletados 50 dias após a primeira inoculação viral.

4.10 Determinação da atividade anticoagulante (Tempo Parcial de Tromboplastina Ativada – APTT) das galactomananas nativas e sulfatadas de *M. scabrella* e de *L. leucocephala*:

A avaliação da atividade anticoagulante dos derivados sulfatados foi realizada porque polímeros sulfatados podem apresentar essa ação, que, no caso de polissacarídeos com atividade antiviral, seria considerado um efeito adverso. O APTT é um teste que explora o sistema intrínseco da coagulação e consiste na determinação do tempo de coagulação de um plasma a 37°C após recalcificação em presença de um substituto plaquetário e de um ativador derivado do ácido elágico (FISCHBACH; FOGDALL, 1985). Os dois polissacarídeos nativos apresentaram tempos de coagulação médios semelhantes ao do plasma normal padrão (30,4 s), em toda a faixa de concentrações testadas (Figura 42). A concentração de heparina necessária para a obtenção de plasma incoagulável (tempo igual ou maior que 120 s) foi de 6,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto que para os derivados sulfatados BRS e LLS foram de 100 e 53,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

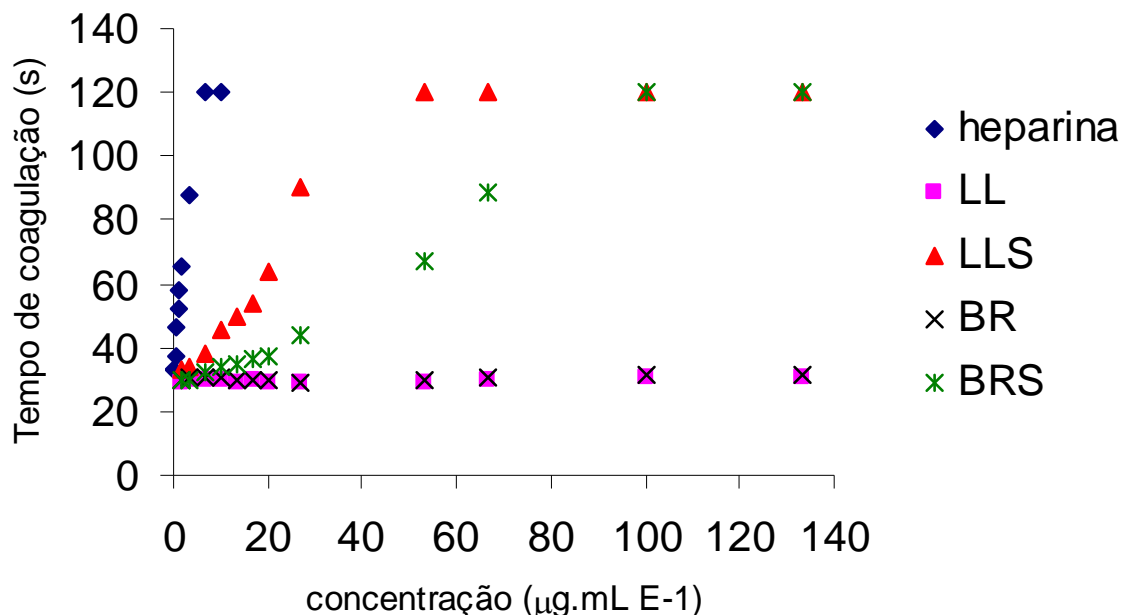


Figura 42: Análise dos tempos de coagulação do plasma em função da concentração, determinado pelo teste do APTT. São considerados incoaguláveis os plasmas com tempo de coagulação iguais ou superiores a 120 s. A concentração é expressa com relação ao volume de plasma utilizado.

As amostras BRS e LLS apresentaram, portanto, atividade anticoagulante que poderia ser considerada um efeito adverso na utilização destes derivados como drogas antivirais. Não foi realizado um estudo de biodisponibilidade *in vivo* ou de tempo de coagulação de plasma dessas amostras após administração intraperitoneal das mesmas a uma dose de 49 mg.kg^{-1} (inoculação de 1 mL de uma solução 1 mg.mL^{-1}) em camundongos, para determinar se há atividade anticoagulante apreciável nas concentrações testadas. Porém, os estudos anteriores de toxicidade *in vivo*, nas doses de até 244 mg.kg^{-1} (inoculação de 1 mL de uma solução 5 mg.mL^{-1}) não levaram camundongos à morte.

De modo interessante, apesar dos dois derivados apresentarem massas moleculares (BRS: $620 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, LLS: $574 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$) e porcentagem de sulfato (BRS: 15,3%, LLS: 14,3%) semelhantes, LLS apresentou atividade anticoagulante 2 vezes maior que BRS, sugerindo que possam existir diferenças estruturais finas entre os dois derivados.

A amostra BRS teria, portanto, menor efeito adverso anticoagulante.

4.11 Ressonância magnética nuclear de carbono-treze (RMN-¹³C) e hidrogênio (RMN-¹H):

São apresentadas as análises das amostras BR (galactomanana nativa de *M. scabrella*), BRS (galactomanana sulfatada de *M. scabrella*), BRSD (derivado sulfatado BRS degradado por oxidação com H₂O₂-Cu⁺⁺), LL (galactomanana nativa de *L. leucocephala*), LLS (galactomanana sulfatada de *L. leucocephala*), LLSd (derivado sulfatado LLS degradado por oxidação com H₂O₂ - Cu⁺⁺).

Os espectros dos derivados foram obtidos a 50°C (com exceção dos espectros de ¹³C e DEPT 135 de BRS e LLS, obtidos a 70°C), uma vez que apresentaram degradação a 80°C em tempo superior a 30 horas, mesmo apresentando pH inicial entre 5 e 6. Os espectros de ¹³C desacoplado e DEPT 135 dos derivados sulfatados só puderam ser obtidos em sonda direta de 10 mm, a 70°C, a uma concentração de 20 mg.mL⁻¹ em D₂O (concentrações superiores foram proibitivas em razão da alta viscosidade das amostras). Devido à maior sensibilidade do núcleo ¹H, os espectros bidimensionais de correlação ¹H-¹H, como os de COSY, TOCSY e ROESY, puderam ser obtidos a 50°C, com as amostras em concentrações entre 15 e 20 mg.mL⁻¹.

Na tentativa de se obter amostras mais solúveis e menos viscosas, realizou-se a degradação das amostras BRS e LLS através de metodologia empregada por NARDELLA *et al.* (1996) e JOUAULT *et al.* (2001), que utiliza quebra da molécula através de oxidação de ligações glicosídicas por peróxido de hidrogênio catalisado por cobre. A reação se processa através da formação de radicais livres do sistema redox H₂O₂-Cu⁺⁺, onde em pH neutro, essas espécies são reativas e degradam a cadeia polissacarídica. Essa metodologia pareceu apropriada uma vez que a despolimerização promovida em polissacarídeos sulfatados, por esses autores, não havia alterado a composição monossacarídica ou promovido dessulfatação significativa nas condições experimentais empregadas. Após diálise em água em membranas com tamanho de corte de 12000 – 14000 Da, a porcentagem de material recuperado foi de 54,8% para BRS e de 41,2% para LLS. O processo empregado permitiu a solubilização em D₂O de 80–100 mg.mL⁻¹ das amostras sulfatadas para serem analisadas a uma temperatura de 50°C, com baixa viscosidade.

Com base no assinalamento dos sinais de hidrogênios anoméricos atribuídos por GANTER *et al.* (1995), para oligossacarídeos de galactomanana de *M. scabrella*, foram identificados os sinais de H-1 de α-galactose (5,02 ppm) e de β-manose (4,76 ppm) para a galactomanana nativa BR (Figura 43, p. 81). No espectro de RMN-¹H do derivado sulfatado

de galactomanana de *M. scabrella* (BRS) (Figura 44) foram identificados os sinais de H-1 de α -galactose (5,02 ppm) e de β -manose (4,76 ppm), além do aparecimento de dois novos sinais (4,05 e 4,21 ppm). Os dois novos sinais observados no espectro de BRS (Figura 44) têm correspondência no espectro do derivado sulfatado despolimerizado de galactomanana de *M. scabrella* (BRSD) e são assinalados em 4,06 e 4,21 ppm (Figura 45, p. 82).

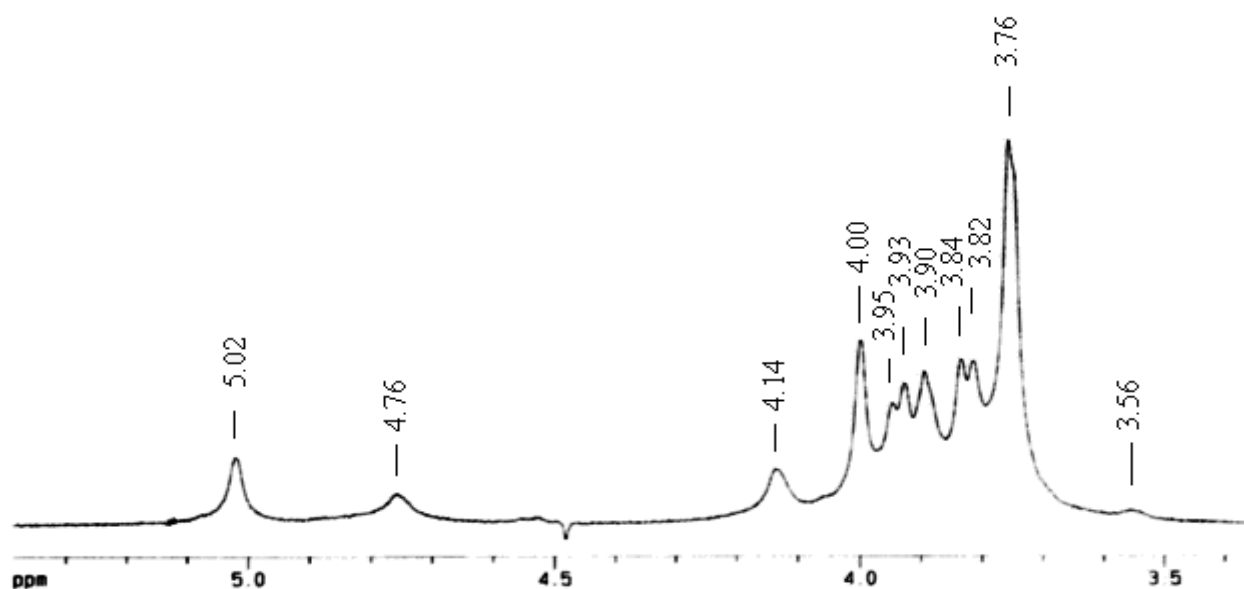


Figura 43: Espectro de RMN-¹H da galactomanana nativa de *M. scabrella* (BR), 20 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.

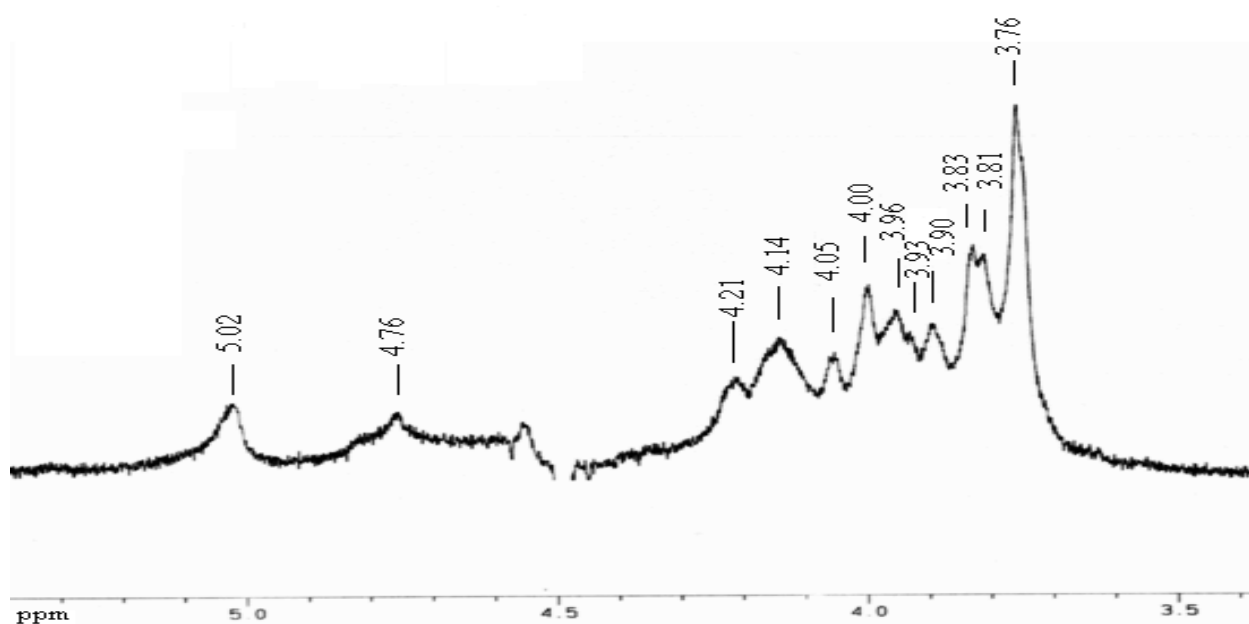


Figura 44: Espectro de RMN-¹H da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação (BRS), 20 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.

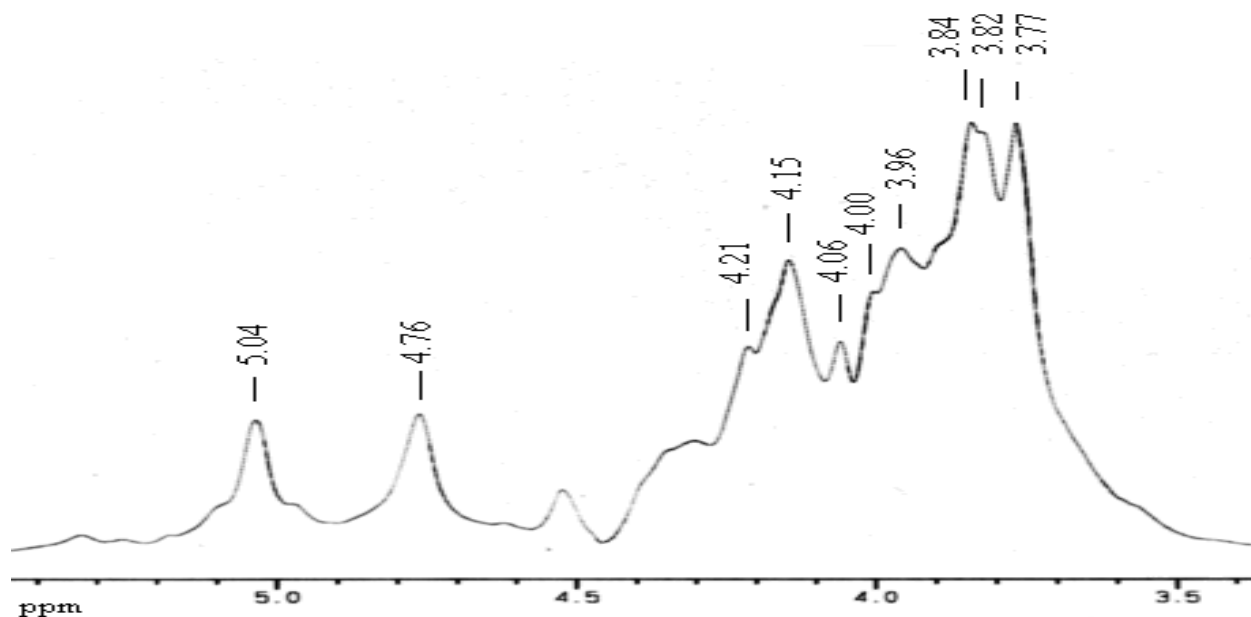


Figura 45: Espectro de RMN-¹H da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 50°C, 400 MHz, com pré-saturação do HOD.

Com base no assinalamento de ¹³C para a galactomanana de *Trigonella foenum-graecum* (Man/Gal: 1,1) (RAMESH *et al.*, 2001) e para a galactomanana de *Schizolobium amazonicum* (Man/Gal: 3,0) (GANTER *et al.*, 1995), foram assinalados os valores obtidos para a galactomanana de *M. scabrella* (Figura 46, p. 83, Tabela 19, p. 85), cuja análise estrutural por RMN-¹³C de seus oligossacarídeos já foi descrito anteriormente por GANTER *et al.* (1995).

O espectro de ¹³C de BRS (Figura 47, p. 83), derivado não degradado por H₂O₂-Cu⁺⁺, obtido a 70°C, é semelhante ao espectro de ¹³C de BRSD (Figura 49, p. 84), indicando que a reação de degradação parece ter preservado a estrutura original do derivado e o espectro de DEPT 135 (Figura 48, p. 84) identifica o sinal em 67,5 ppm, como sendo um carbono metilênico, portanto, confirmando ser o sinal de um C-6 em galactomananas. No espectro de BRS obtido em sonda de 10 mm a 70°C (DEPT 135, Figura 48, p. 84), verifica-se o aparecimento de sinais em 93,7 e 96,5 ppm, que corresponderiam a sinais de C-1 de α-D-Gal livre e de β-D-Gal livre, respectivamente (AGRAWALL, 1992), indicando degradação da amostra a 70°C.

Comparando-se os deslocamento químicos de ¹³C observados por RAMESH *et al.* (2001) e GANTER *et al.* (1995), foram identificados, no espectro de BRSD (Figura 49, p. 84), 3 sinais de carbonos anoméricos (C-1 Man: 100,0 ppm; C-1 Gal: 98,9 e 98,7 ppm), C-6 Gal (61,2 ppm), C-6 Man não substituída (60,5 ppm) e C-6 Man substituída por galactose (66,5

ppm), que são observados onde não há sobreposição de sinais em espectros de galactomananas. Por comparação com o espectro de ^{13}C da galactomanana nativa de *M. scabrella* (Figura 46), puderam ser identificados os seguintes sinais: C-2 Gal (68,4 ppm), C-3 Gal (69,4 ppm), C-4 Gal (69,3 ppm), C-5 Gal (71,2 ppm), C-2 Man (69,9 ppm), C-3 Man (71,3 ppm), C-4 Man (77,0 ppm), C-5 Man (73,2 ppm). Além do segundo sinal de C-1 Gal (98,9 ppm) anteriormente citado, foram observados também novos sinais em 67,5 ppm, 69,0 ppm e 68,3 ppm.

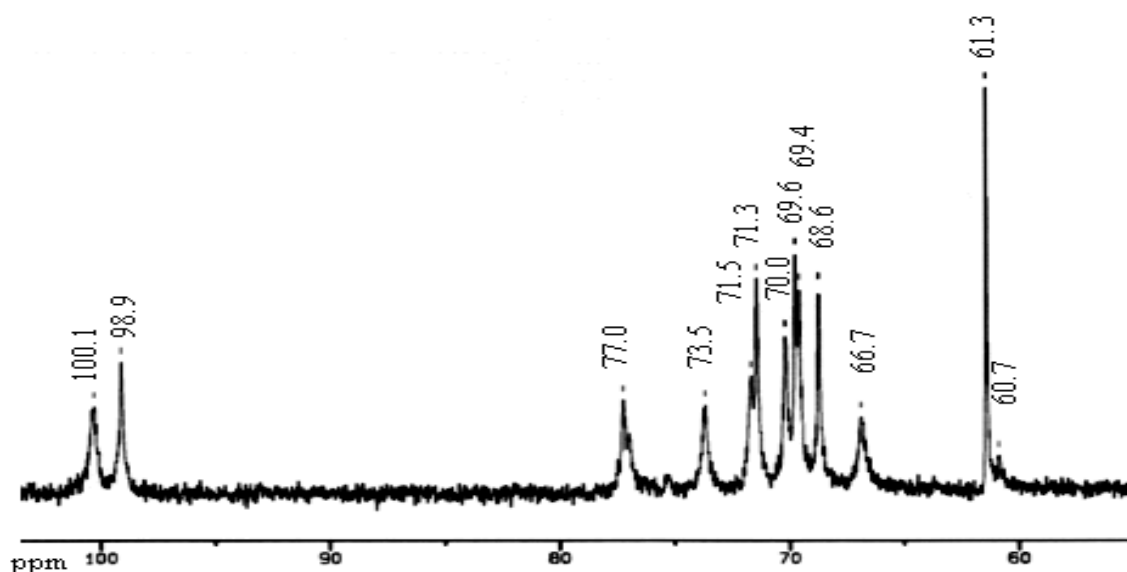


Figura 46: Espectro de RMN- ^{13}C da galactomanana nativa de sementes de *M. scabrella* (BR), 30 mg.mL $^{-1}$ em D $_2$ O, a 70°C, 100 MHz.

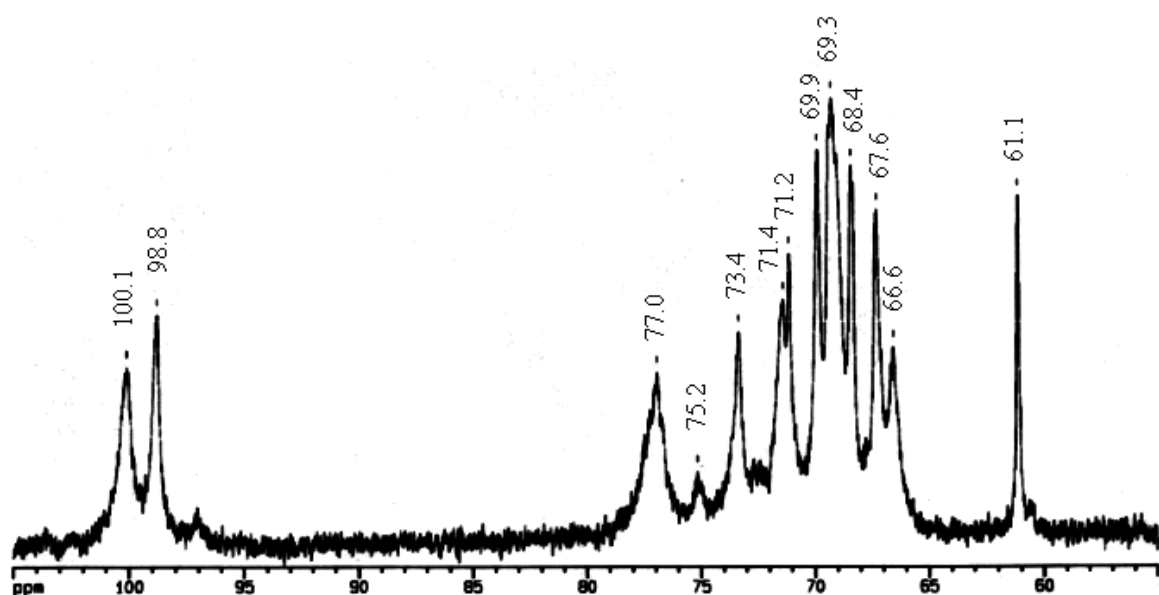


Figura 47: Espectro de RMN- ^{13}C da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação (BRS), 20 mg.mL $^{-1}$ em D $_2$ O, a 70°C, sonda de 10 mm, 100 MHz.

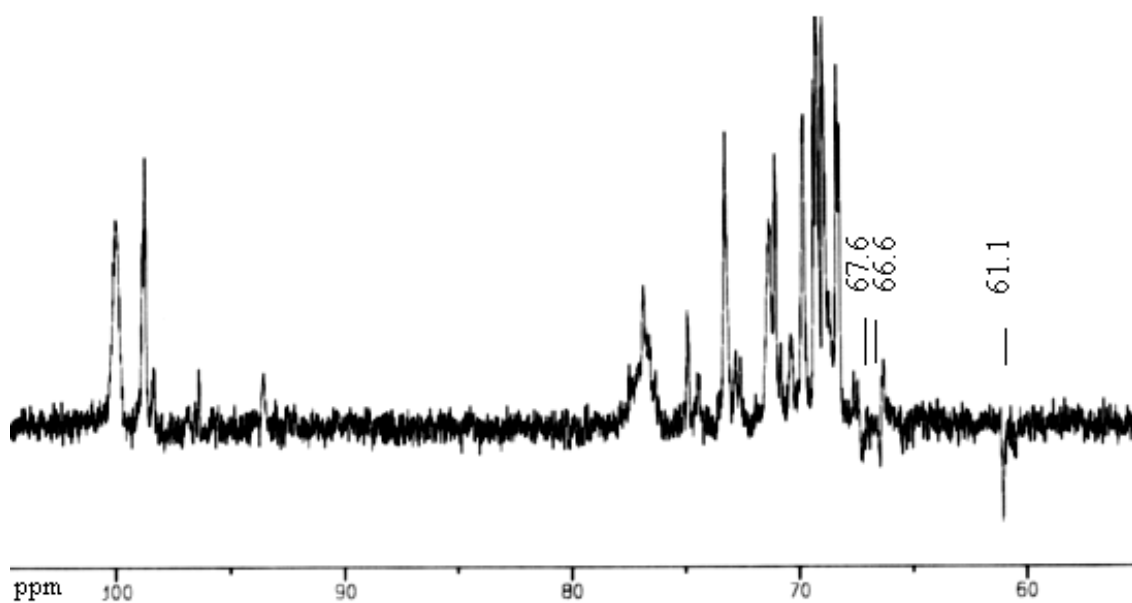


Figura 48: Espectro de RMN-¹³C DEPT 135 da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação (BRS), 20 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 70°C, sonda de 10 mm, 100 MHz.

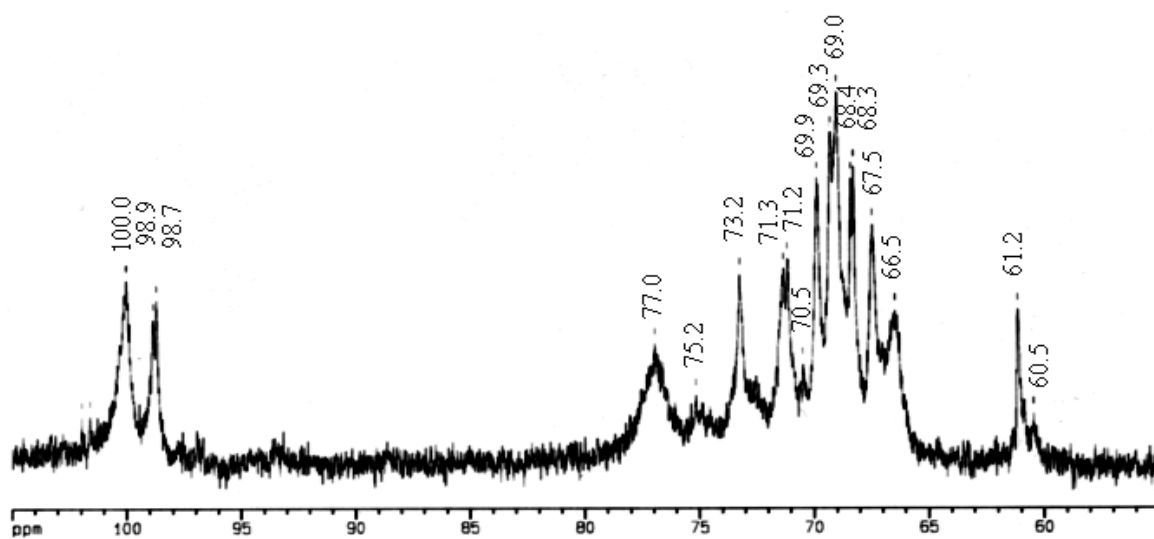


Figura 49: Espectro de RMN-¹³C da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 50°C, 100 MHz.

Tabela 19: Atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C -RMN da galactomanana nativa de sementes de *M. scabrella*:

Posição	^{13}C (ppm)	Posição	^{13}C (ppm)
Galactose		Manose	
1	98,9	1	100,1
2	68,6	2	70,0
3	69,6	3	71,5
4	69,4	4	77,0
5	71,3	5	73,5
6	61,3	6	66,7 / 60,7*

* C-6 de manose não substituída por galactose.

Quando uma hexose livre é tratada em condições brandas com um agente sulfatante, o primeiro éster formado seria o 6-sulfato, devido à maior reatividade de grupos hidroxílicos primários a agentes esterificantes. A escolha do agente sulfatante, solvente e temperatura parece influenciar na posição dos substituintes sulfato nos derivados sintetizados (TURVEY, 1965). WHISTLER e SPENCER (1961) observaram que polissacarídeos como dextranas e ácido algínico, que apresentam pouco ou nenhum grupo hidroxílico primário livre, apresentaram baixo grau de derivatização quando submetidos à reação de sulfatação, sugerindo que os grupos de hidroxilas primárias estariam inicialmente envolvidos na sulfatação. A galactomanana de *M. scabrella*, bastante substituída (Man:Gal 1,1), apresenta predominantemente como hidroxilas primárias livres a 6-OH de galactose. A comparação dos novos sinais observados para BRS (Figura 47, p. 83) ou BRSD (Figura 49, p. 84) com os valores observados por CONTRERAS *et al.* (1988) para metil α -D-galactopiranosídeos 2-, 3-, 4- e 6- monossulfatados mostra que o deslocamento esperado para uma substituição em C-6 Gal seria de + 6,33 ppm para ^{13}C e de + 0,473 ppm para ^1H (Tabela 20, p. 86), portanto, o sinal observado em 67,5 ppm, correlacionado ao ^1H : 4,21 ppm (Figura 61, p. 119), pode ser atribuído ao C-6 Gal 6-SO₄. Todos os espectros bidimensionais obtidos para a galactomanana nativa (BR), derivado sulfatado (BRS) e derivado sulfatado despolimerizado (BRSD) de *M. scabrella* são apresentados no anexo referente (p. 118-129).

Tabela 20: Dados de RMN-¹³C e ¹H para metil α-D-galactopiranosose 6-SO₄ (CONTRERAS *et al.*, 1988):

δ _{13C} , ppm (deslocamento relativo, ppm)			δ _{1H} , ppm (deslocamento relativo, ppm)		
	Metil α-D-Gal	Metil α-D-Gal 6-SO ₄		Metil α-D-Gal	Metil α-D-Gal 6-SO ₄
C-1	100,67	100,62 (- 0,05)	H-1	4,837	4,842 (+ 0,005)
C-2	69,47	69,3 (- 0,17)	H-2	3,819	3,830 (+ 0,011)
C-3	70,76	70,23 (- 0,53)	H-3	3,811	3,828 (+ 0,017)
C-4	70,50	70,49 (- 0,01)	H-4	3,968	4,018 (+ 0,050)
C-5	71,99	69,73 (- 2,26)	H-5	3,897	4,148 (+0,251)
C-6	62,50	68,83 (+ 6,33)	H-6	3,74 / 3,752	4,214 (+ 0,473) / 4,158 (+ 0,406)

Por comparação com os deslocamentos para campo mais baixo ou mais alto dos sinais de galactose sulfatada em C-6, os novos sinais identificados em BRSD (Figuras 60 e 61, p. 118-119) poderiam ser atribuídos como: C-6 / H-6 Gal 6-SO₄ (67,5 / 4,21 ppm), C-5 / H-5 Gal 6-SO₄ (69,0 / 4,13 ppm), C-4 / H-4 Gal 6-SO₄ (69,3 / 4,06 ppm) e C-2 / H-2 Gal 6-SO₄ (68,3 / 3,82 ppm). O desdobramento do sinal de carbono anomérico de galactose poderia ser atribuído a C-1 / H-1 de Galactose 6-sulfato (98,9 / 5,04 ppm), por estar mais desprotegido.

O espectro de COSY de BR (Figura 62, p. 120) permitiu a identificação dos acoplamentos vicinais H-1 Gal / H-2 Gal (5,02 / 3,84 ppm), H-2 Gal / H-3 Gal (3,84 / 3,93 ppm), H-3 Gal / H-4 Gal (3,93 / 4,00 ppm), H-1 Man / H-2 man (4,76 / 4,14 ppm), H-2 man / H-3 Man (4,14 / 3,82 ppm).

O espectro de COSY de BRS (Figura 63, p. 121) permitiu a identificação dos acoplamentos vicinais H-1 Gal / H-2 Gal (5,02 / 3,83 ppm), H-2 Gal / H-3 Gal (3,83 / 3,93 ppm), H-3 Gal / H-4 Gal (3,93 / 4,00 ppm), não sendo possível identificar os sinais de correlação vicinal entre os hidrogênios da manose.

No espectro de ¹H-¹H COSY (Figura 64, p. 122) de BRSD, de correlação homonuclear a 2 e 3 ligações químicas, onde é possível visualizar os acoplamentos entre hidrogênios ligados geminal e vicinalmente, observam-se as seguintes correlações: H-1 / H-2 Gal (5,04 / 3,84 ppm), H-2 / H-3 Gal (3,84 / 3,96 ppm), H-2 / H-3 Man (4,14 / 3,79 ppm), H-3 / H-4 Man (3,79 / 3,86 ppm), H-4 / H-5 Gal 6-SO₄ (4,06 / 4,13 ppm), H-5 / H-6 Gal 6-SO₄ (4,13 / 4,21 ppm).

No espectro de TOCSY de BR (Figura 65, p. 123), que mostra os acoplamentos entre hidrogênios dentro de um mesmo anel, foram observadas as seguintes correlações a 4 ou mais

ligações químicas: H-1 Gal / H-3 Gal (5,02 / 3,93 ppm) e H-1 Gal / H-4 Gal (5,02 / 4,00 ppm), confirmando que esses sinais pertencem ao anel de galactose.

No espectro de TOCSY de BRS (Figura 66, p. 124) foram observados os acoplamentos H-1 Gal / H-3 Gal (5,02 / 3,93 ppm) e H-1 Gal / H-4 Gal (5,02 / 4,00 ppm).

No espectro de TOCSY de BRSD (Figura 67, p. 125), foram observados os acoplamentos: H-1 / H-3 Gal (5,04 / 3,92 ppm), H-1 / H-4 Gal (5,04 / 4,00 ppm), H-2 / H-4 Man (4,14 / 3,86 ppm), H-2 / H-4 Gal 6-SO₄ (3,82 / 4,06 ppm).

No espectro de ROESY de BR (Figura 68, p. 126) que mostra os acoplamentos dipolares entre os hidrogênios, foram observadas as correlações H-1 Gal / H-6 Man (5,02 / 3,95 ppm) e H-1 Gal / H-4 Gal (5,02 / 4,00 ppm), indicando, no primeiro caso, a proximidade de hidrogênios de carbonos unidos por ligação glicosídica e no segundo caso, provavelmente, a proximidade entre hidrogênios presentes em 2 unidades diferentes de galactose, uma vez que são galactomananas bastante substituídas.

No espectro de ROESY de BRS (Figura 69, p. 127) foi observada a correlação H-1 Gal / H-4 Gal (5,02 / 4,00 ppm), indicando provavelmente, a proximidade entre hidrogênios presentes em 2 unidades diferentes de galactose.

No espectro de HMBC de BRSD (Figuras 70 e 71, p. 128-129), onde se obtêm as correlações ¹H-¹³C a 2 ou 3 ligações químicas, foram observados os seguintes acoplamentos: ³J H-1_{Gal} / C-3_{Gal} (5,04 / 69,4 ppm), ²J H-1_{Man} / C-2_{Man} (4,76 / 69,9 ppm), ³J H-1_{Man} / C-3_{Man} (4,76 / 71,3 ppm), ³J H-1_{Man}/C-4_{Man} (4,76 / 77,0 ppm), ²J H-6_{Gal 6-SO₄} / C-5_{Gal 6-SO₄} (4,21 / 69,0 ppm), ²J H-5_{Gal} / C-4_{Gal} (3,89 / 69,3 ppm), ²J H-2_{Man} / C-3_{Man} (4,14 / 71,3 ppm), ²J H-5_{Gal} / C-4_{Gal} (3,89 / 69,3 ppm), ²J H-3_{Man} / C-2_{Man} (3,79 / 69,9 ppm), ²J H-5_{Man} / C-6_{Man substituída} (3,75 / 66,5 ppm), ³J H-6_{Gal} / C-4_{Gal} (3,77 / 69,3 ppm), ²J H-6_{Gal} / C-5_{Gal} (3,77 / 71,2 ppm).

As atribuições dos sinais de BRSD podem ser resumidas na Tabela 21 (p. 88), que dá as correlações encontradas no espectro de HMQC (Figuras 60 e 61, p. 118-119). Não foi possível atribuir o hidrogênio ligado ao C-3 Gal 6-SO₄, deduzido pelos valores encontrados por CONTRERAS *et al.* (1988) e tanto C-2 quanto o C-3 de galactose sulfatada em C-6 não tiveram seus assinalamentos confirmados pelos espectros bidimensionais.

Tabela 21: Atribuições das correlações ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HMQC de BRSD:

δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	Atribuição
100,0	4,76	C-1 / H-1 Man
98,9	5,04	C-1 / H-1 Gal 6-SO ₄
98,7	5,04	C-1 / H-1 Gal
77,0	3,86	C-4 / H-4 Mans e ns
73,2	3,75	C-5 / H-5 Man
71,3	3,79	C-3 / H-3 Man
71,2	3,89	C-5 / H-5 Gal
69,9	4,14	C-2 / H-2 Man
69,4	3,96	C-3 / H-3 Gal
69,3	4,06	C-4 / H-4 Gal 6-SO ₄
69,3	4,00	C-4 / H-4 Gal
69,0	4,13	C-5 / H-5 Gal 6-SO ₄
68,4	3,84	C-2 / H-2 Gal
68,3	3,82	C-2 / H-2 Gal 6-SO ₄
67,5	4,21	C-6 / H-6 Gal 6-SO ₄
66,5	3,96	C-6 / H-6 Man
61,2	3,77	C-6 / H-6 Gal

* s: substituída

* ns: não substituída

No espectro de RMN- ^1H da galactomanana nativa de *L. leucocephala* (LL) (Figura 50, p. 89) foram identificados os sinais de H-1 de galactose (5,02 ppm) e de manose (4,75 ppm).

No espectro da galactomanana sulfatada de *L. leucocephala* (LLS) (Figura 51, p. 89) foram identificados os sinais de H-1 de galactose (5,02 ppm) e de manose (4,75 ppm). O espectro de ^1H com supressão do HOD (Figura 51, p. 89) de LLS não apresentou diferença observável com o espectro da galactomanana nativa LL (Figura 50, p. 89), indicando que pode ter ocorrido sulfatação em posições diferentes das de BRS.

O espectro de ^1H de LLSD (Figura 52, p. 90) também não permitiu observar diferenças com relação ao espectro da amostra nativa LL (Figura 50, p. 89), com exceção de sinais de baixa intensidade em 4,21 e 3,68 ppm. Realizou-se uma análise de RMN- ^1H a 30°C (Figura 53, p. 90), de modo a deslocar o sinal do HOD para campo mais baixo, verificando-se que o sinal em 4,21 ppm ainda era observado.

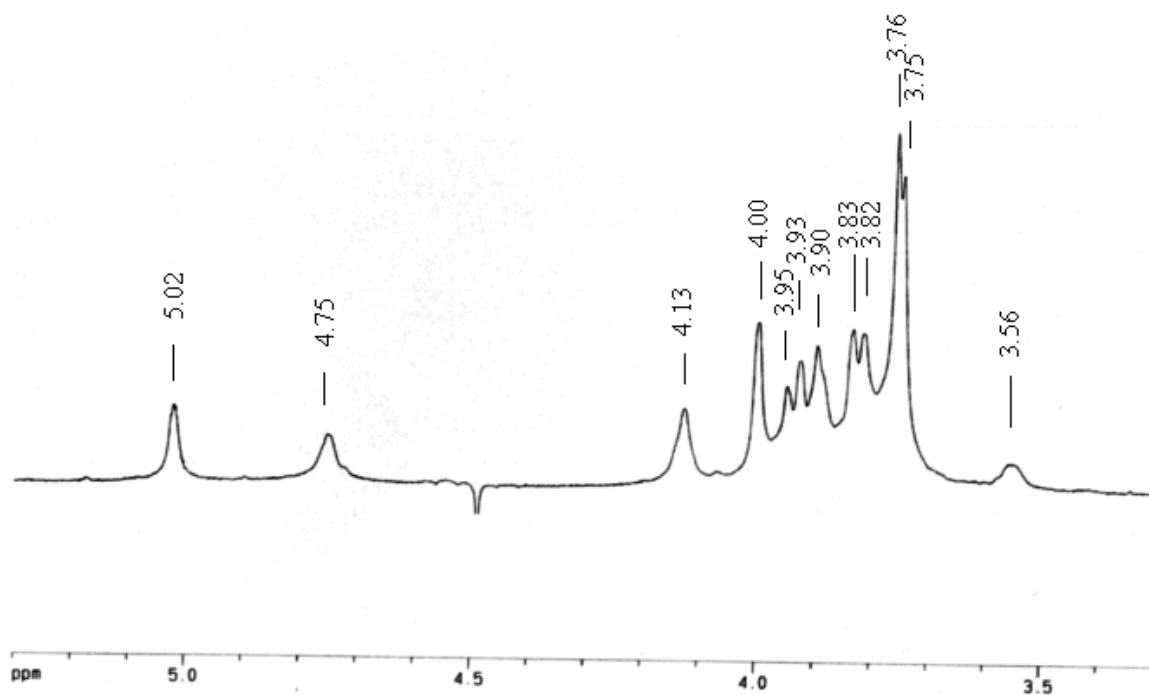


Figura 50: Espectro de RMN- ^1H da galactomanana nativa de sementes de *L. leucocephala* (LL), $15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 500 MHz), com supressão do HOD.

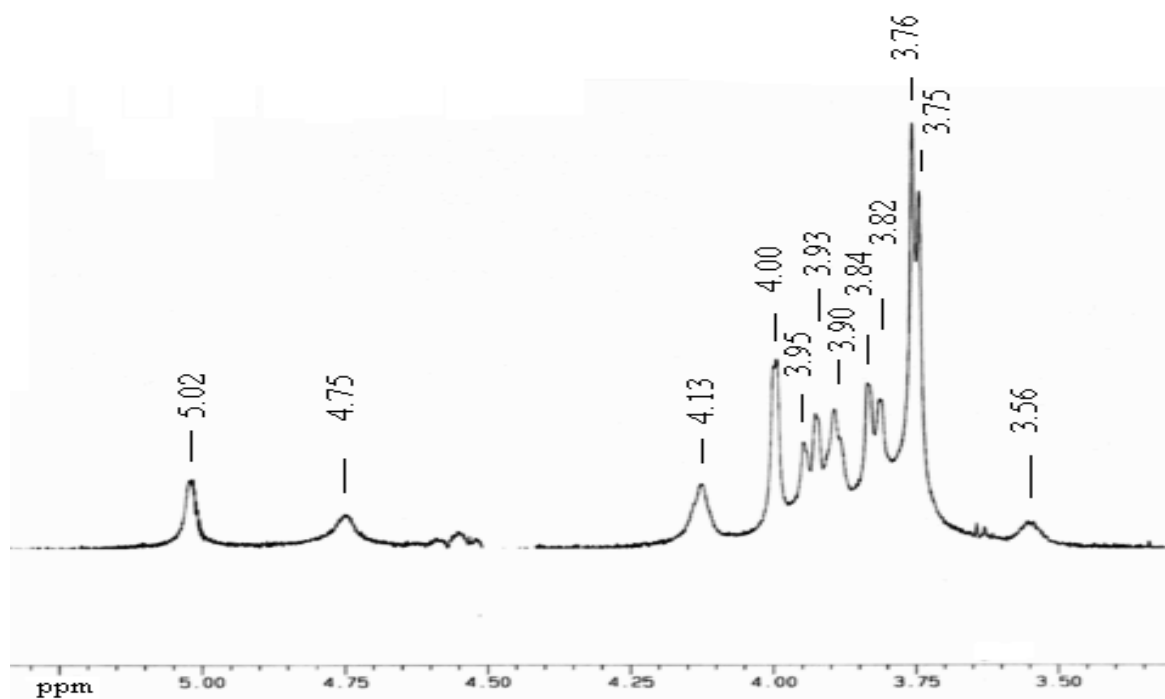


Figura 51: Espectro de RMN- ^1H da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação (LLS), $15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.

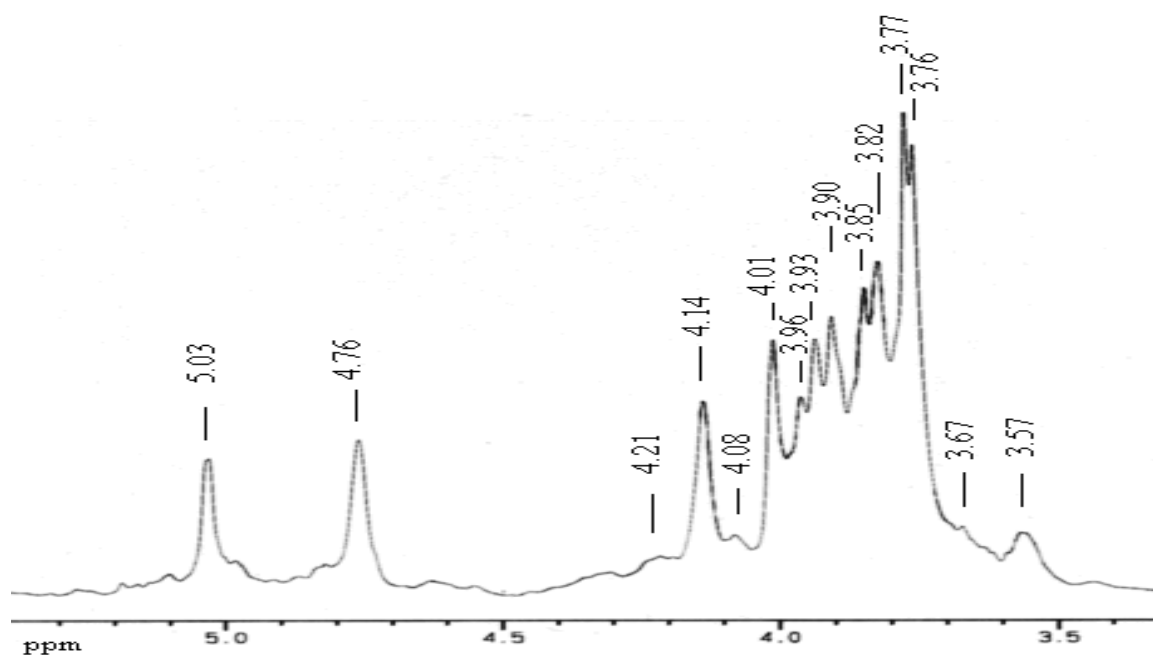


Figura 52: Espectro de RMN- ^1H da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz), com pré-saturação do HOD.

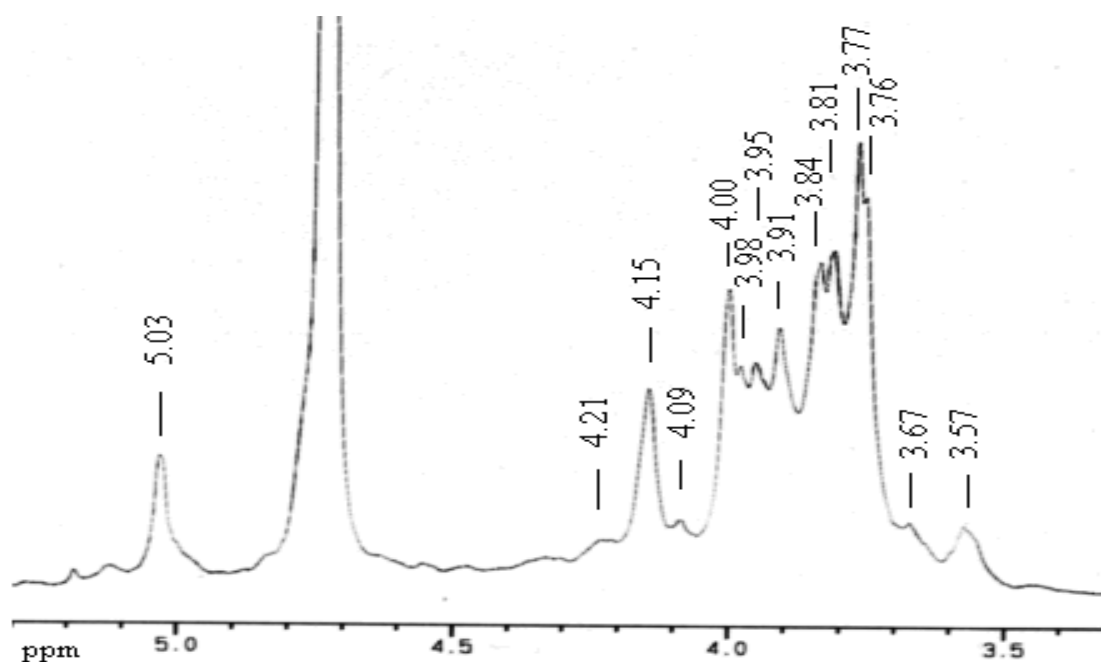


Figura 53: Espectro de RMN- ^1H da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 30°C , (^1H : 400 MHz).

Com base no assinalamento de ^{13}C para a galactomanana de *Trigonella foenum-graecum* (Man/Gal: 1,1) (RAMESH *et al.*, 2001) e para a galactomanana de *Schizolobium amazonicum* (Man/Gal: 3,0) (GANTER *et al.*, 1995), foram assinalados os valores obtidos para a galactomanana de *L. leucocephala* (Figura 54, p. 92, Tabela 22, p. 94).

O espectro de ^{13}C de LLS (Figura 55, p. 92), derivado não degradado por $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{++}$, obtido a 70°C , é semelhante ao espectro de ^{13}C de LLSD (Figuras 57 e 58, p. 93-94), indicando que a reação de degradação parece ter preservado a estrutura original do derivado.

Por comparação com os sinais de ^{13}C assinalados para a galactomanana de *L. leucocephala* (Tabela 22, p. 94), foram identificadas nas regiões não sobrepostas do espectro de ^{13}C de LLSD (Figuras 57 e 58, p. 93-94), 3 sinais de carbonos anoméricos (C-1 Man: 100,1 e 99,9 ppm, C-1 Gal: 98,8 ppm) e os sinais de C-6 Mans (substituída por galactose) (66,5 ppm), C-6 Gal (61,1 ppm) e C-6 Manns (não substituída) (60,5 ppm). Os sinais de C-6 de galactose e de manose foram confirmados pelo espectro de DEPT 135 (Figura 56, p. 93), através da inversão desses sinais. A análise comparativa levou à identificação dos seguintes sinais: C-2 Gal (68,4 ppm), C-3 Gal (69,4 ppm), C-4 Gal (69,3 ppm), C-5 Gal (71,3 ppm), C-2 Man (69,9 ppm), C-3 Mans (71,4 ppm), C-3 Manns (71,2 ppm), C-4 Man (76,7 ppm), C-5 Man (73,4 ppm), C-5 Manns: (75,0 ppm). A análise dos espectros de ^{13}C obtidos para a amostra LLS em 70°C em sonda direta de 10 mm (Figura 55, p. 92) e de LLSD a 50°C em sonda inversa de 5 mm (Figura 58, p. 94), embora possam ter sido adquiridas com alguma perda de grupos sulfato, apresenta evidência de um novo sinal em 66,7 ppm, sobreposto ao sinal em 66,5 ppm, que corresponde ao C-6 de manose substituída. Levando-se em consideração a probabilidade de sulfatação em C-6 Gal e C-6 Man (que são carbonos primários), esse sinal poderia corresponder ao C-6 Man 6- SO_4 . Aqui, um fato importante a ser considerado é que a galactomanana nativa LL, menos substituída (Man/Gal 1,4), que apresenta tanto C-6 Gal como C-6 Man com hidroxilas primárias livres, parece ter sido sulfatada preferencialmente nas unidades de manose. Comportamento semelhante foi observado por SIERAKOWSKI *et al.* (2000) quando oxidaram especificamente C-6 de galactomanana de *L. leucocephala*, conseguindo oxidação total dos C-6 de manose e parcial dos C-6 de galactose. É possível que o aquecimento da amostra a 70°C durante 12 horas (tempo de aquisição do espectro de LLS) ou a degradação com $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}$ para a produção de LLSD tenham levado à perda de grupos sulfato, porém, se não houve perda, a dosagem de sulfato com o BaCl_2 estaria superestimada. De qualquer maneira, o espectro de ^1H de LLS, obtido a 50°C (Figura 51, p. 89), onde não haveria degradação da amostra, mostra pouca diferença com relação ao espectro nativo (Figura 50, p. 89) e a presença de sulfato no

derivado LLS é confirmada pela análise de infravermelho (Figura 28, p. 60) e pelo teste de atividade anticoagulante (Figura 42, p. 78).

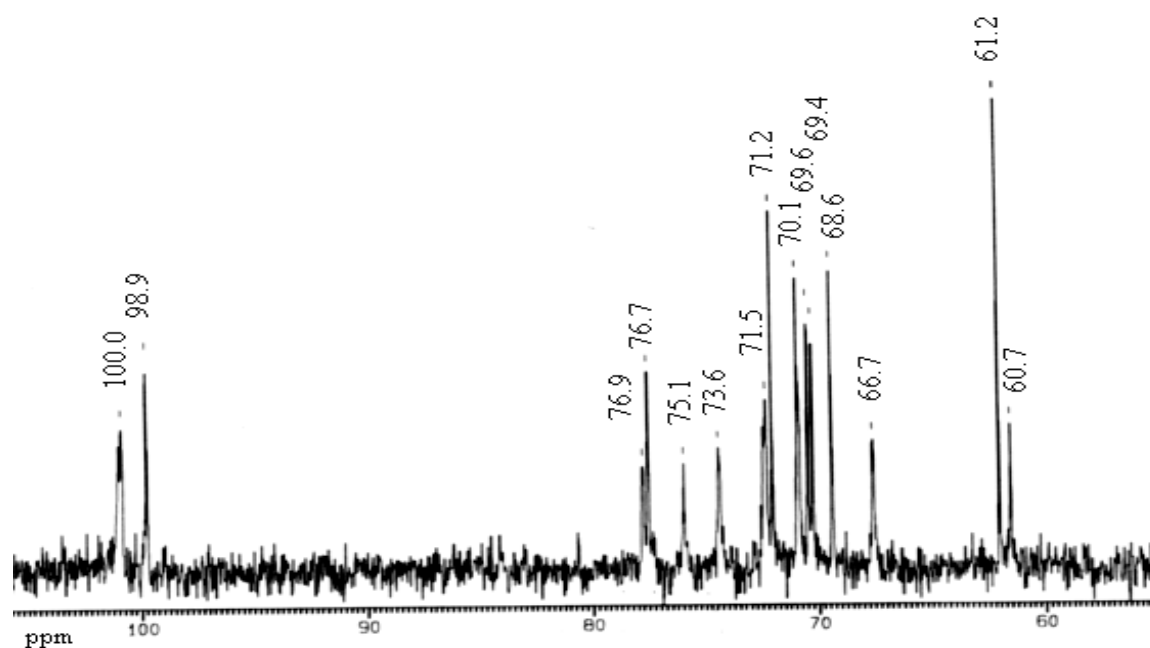


Figura 54: Espectro de RMN-¹³C da galactomanana nativa de sementes de *L. leucocephala* (LL), 30 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 70°C, (¹³C: 100 MHz).

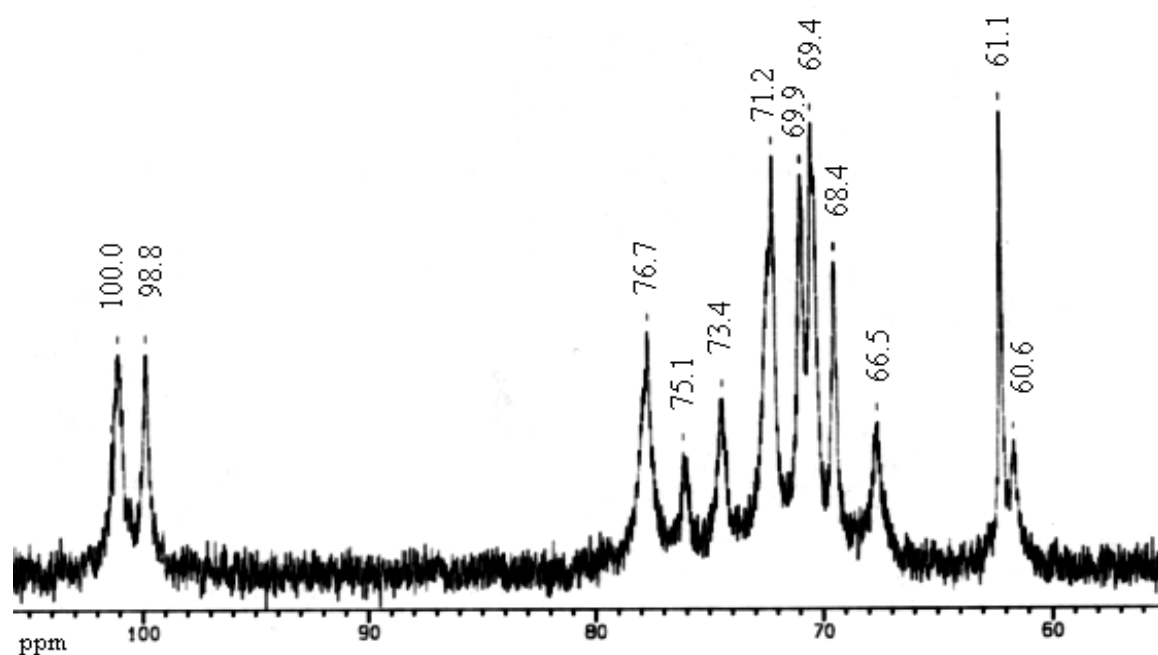


Figura 55: Espectro de RMN-¹³C da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação (LLS), 20 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 70°C, sonda de 10 mm, 100 MHz.

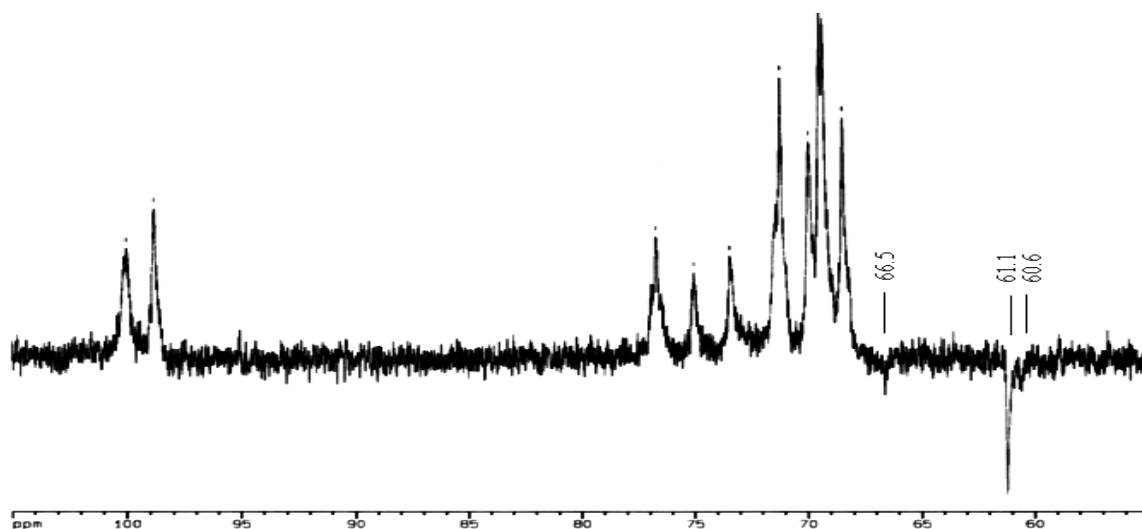


Figura 56: Espectro de RMN- ^{13}C DEPT 135 da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação (LLS), $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 70°C , sonda de 10 mm, 100 MHz.

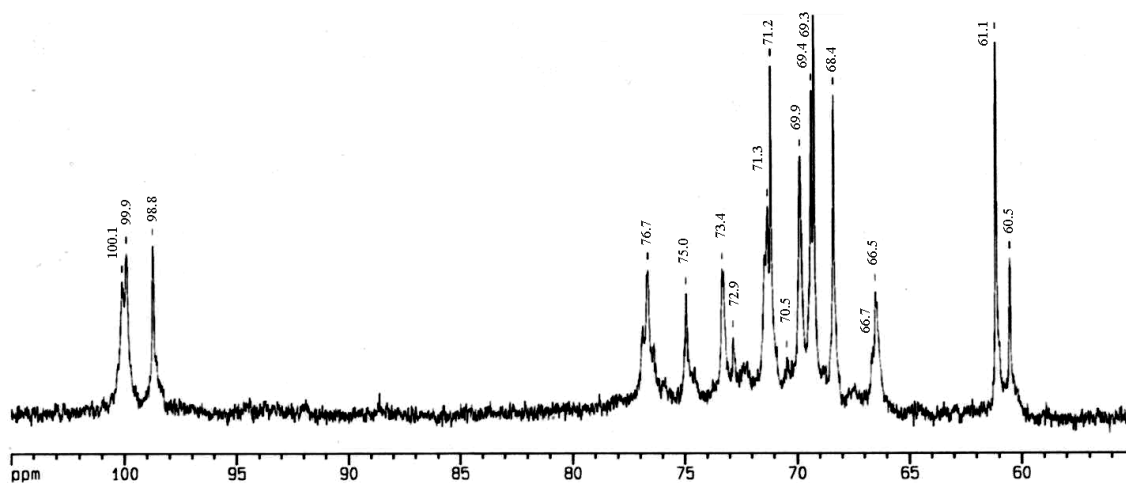


Figura 57: Espectro de RMN- ^{13}C da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , 100 MHz.

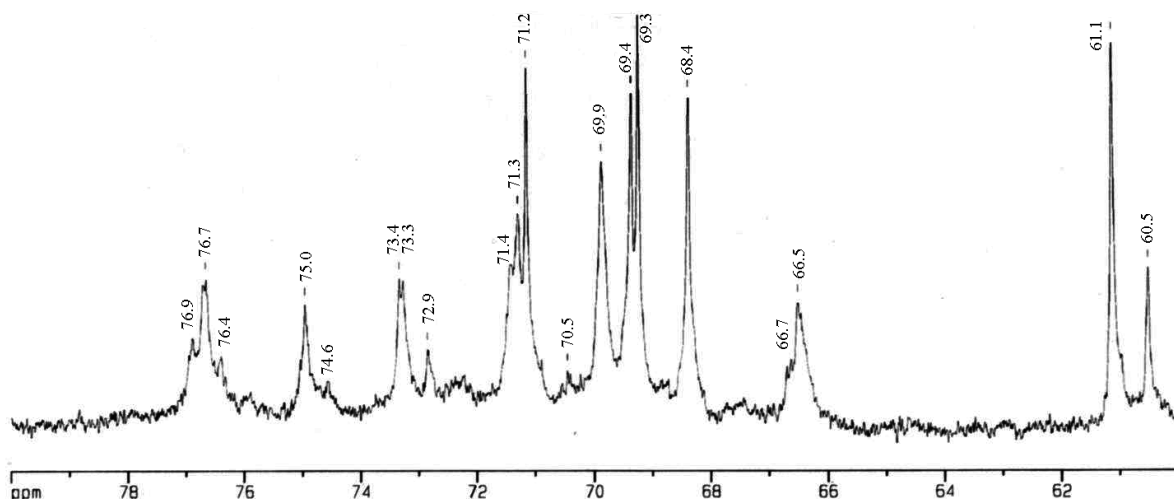


Figura 58: Expansão do espectro de RMN- ^{13}C da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , 100 MHz.

Tabela 22: Atribuições dos deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C da galactomanana de sementes de *L. leucocephala*:

Posição	^{13}C (ppm)	Posição	^{13}C (ppm)
Galactose		Manose	
1	98,9	1	100,1
2	68,6	2	70,1
3	69,6	3	71,5
4	69,4	4	76,9 / 76,7*
5	71,2	5	75,1* / 73,6
6	61,2	6	66,7 / 60,7*

* Manose não substituída por galactose

A comparação dos sinais de ^{13}C da região de C-4 de manose também confirma as diferenças de estrutura fina entre as galactomananas BR e LL (Figura 59), observando-se em BR, sinal relacionado a manose substituída em maior intensidade que LL.

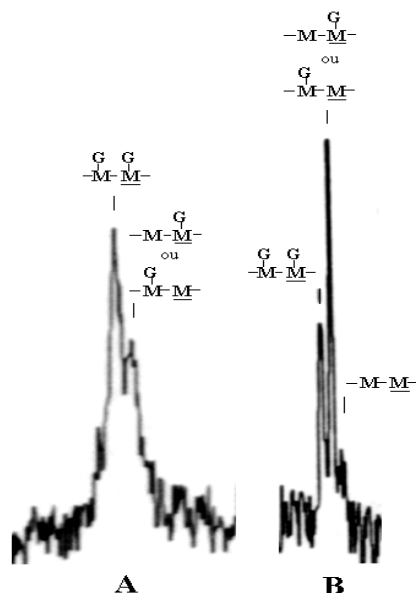


Figura 59: Expansão da região de C-4 de manose das galactomananas nativas BR (A) e LL (B) em D_2O , a 70°C , $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 100 MHz .

A Tabela 23 (p. 96), que compara os deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C para metil α -D-manopiranosose e metil 6-O-sulfonato- α -D-manopiranosose mostra que a sulfatação de C-6 Man levaria a um deslocamento no sinal de C-6 Man de $+ 6,03 \text{ ppm}$ e em C-5 Man de $- 2,3 \text{ ppm}$. Já o sinal de H-6 Man seria deslocado em $+ 0,46 \text{ ppm}$ e H-5 Man em $+ 0,23 \text{ ppm}$. KOLENDER *et al.* (1997) também observam na análise de uma α -(1 \rightarrow 3)-D-manana sulfatada, que unidades com ou sem grupo sulfato em C-6 diferem apenas nos deslocamentos químicos de C-6 (que na unidade sulfatada é deslocado em $+ 6,4 \text{ ppm}$) e de C-5 (que é deslocado em $- 0,2 \text{ ppm}$).

Tabela 23: Dados de RMN-¹³C e ¹H para metil 6-O-sulfonato- α -D-manopiranosose (BERLININD *et al.*, 1994; VIDAL *et al.*, 2002):

δ_{13C} , ppm (deslocamento relativo, ppm)		δ_{1H} , ppm (deslocamento relativo, ppm)			
Metil α -D-Man		*Metil α -D-Man 6-SO ₄	Metil α -D-Man		**Metil α -D-Man 6-SO ₄
C-1	101,4	101,3	H-1	4,64	4,64
C-2	70,5	70,2	H-2	3,81	3,81
C-3	71,2	70,7	H-3	3,64	3,65
C-4	67,4	66,7	H-4	3,54	3,56
C-5	73,1	70,8 (- 2,3)	H-5	3,48	3,71 (+0,23)
C-6	6,6	67,6 (+ 6,0)	H-6	3,65 / 3,77	4,10 (+ 0,45) / 4,23 (+ 0,46)

* os valores foram corrigidos pelo sinal do OCH₃ de 55,55 para 55,2 ppm.

** os valores foram corrigidos pelo sinal do OCH₃ de 3,42 para 3,29 ppm.

Verifica-se que além do novo sinal em 66,7 ppm para LLS (Figura 58, p. 94), que poderia ser atribuído ao C-6 Man 6-SO₄ (com um deslocamento de + 6,2 ppm para campo baixo), o outro novo sinal observado em 72,9 ppm poderia ser atribuído ao C-5 Man 6-SO₄ (com um deslocamento para campo alto de - 2,1 ppm). Todos os espectros bidimensionais obtidos para a galactomanana nativa (LL), derivado sulfatado (LLS) e derivado sulfatado despolimerizado (LLSD) de *L. leucocephala* são apresentados no anexo referente (p. 131-140). O espectro de HMQC (Figuras 72, 73 e 74, p. 131-133) mostra que o hidrogênio diretamente ligado ao C-5 Man 6-SO₄ tem δ_{1H} : 3,68 ppm, o que corresponderia a uma diferença de 0,13 ppm com relação ao sinal de H-5 Man sem sulfato (δ_{1H} : 3,55 ppm). O novo sinal, pouco intenso, observado em 4,21 ppm, no espectro de ¹H, sem supressão do HOD a 30°C (Figura 53, p. 90), poderia corresponder ao sinal de H-6 de Man 6-SO₄. Como os espectros bidimensionais foram obtidos com a supressão do HOD, a correlação desse sinal em 4,21 ppm com o sinal de C-6 Man 6-SO₄ poderia ser de difícil detecção. De fato, verifica-se uma correlação entre os sinais 4,21 e 66,7 ppm no espectro de HMQC (Figura 74, p. 133) que se confunde com o ruído do espectro.

O espectro de COSY de LL (Figura 75, p. 134) permitiu a identificação dos acoplamentos vicinais H-1 Gal / H-2 Gal (5,02 / 3,83 ppm), H-2 Gal / H-3 Gal (3,83 / 3,93 ppm), H-3 Gal / H-4 Gal (3,93 / 4,00 ppm), H-1 Man / H-2 Man (4,75 / 4,13 ppm), H-2 Man / H-3 Man (4,13 / 3,82 ppm). O espectro de COSY de LLS (Figura 76, p. 135) permitiu a

identificação dos acoplamentos vicinais H-1 Gal / H-2 Gal (5,02 / 3,84 ppm) e H-2 Gal / H-3 Gal (3,84 / 3,93 ppm).

No espectro de TOCSY de LL (Figura 77, p. 136) foram observadas as seguintes correlações $^1\text{H}-^1\text{H}$ a 4 ou mais ligações: H-1 Gal / H-3 Gal (5,02 / 3,93 ppm) e H-1 Gal / H-4 Gal (5,02 / 4,00 ppm), confirmando que esses sinais pertencem ao anel de galactose. No espectro de TOCSY de LLS (Figura 78, p. 137) foram observadas as correlações H-1 Gal / H-3 Gal (5,02 / 3,93 ppm) e H-1 Gal / H-4 Gal (5,02 / 4,00 ppm). No espectro de TOCSY de LLSD (Figura 79, p. 138) foram observadas as correlações: H-1 / H-3 Gal (5,03 / 3,94 ppm), H-1 / H-4 Gal (5,03 / 4,03 ppm).

No espectro de ROESY de LL (Figura 80, p. 139) que mostra os acoplamentos dipolares entre os hidrogênios, foram observadas as correlações H-1 Gal / H-6 Man (5,02 / 3,95 ppm) e H-1 Gal / H-4 Gal (5,02 / 4,00 ppm).

No espectro de HMBC (Figura 81, p. 140) de LLSD foram identificadas as seguintes correlações: $^2\text{J H-1}_{\text{Man}} / \text{C-2}_{\text{Man}}$ (4,76 / 69,9 ppm), $^3\text{J H-1}_{\text{Man}} / \text{C-3}_{\text{Man}}$ (4,76 / 71,4 ppm), $^3\text{J H-1}_{\text{Man}} / \text{C-5}_{\text{Man}}$ (4,76 / 73,4 ppm), $^3\text{J H-1}_{\text{Man}} / \text{C-4}_{\text{Man}}$ (4,76 / 76,7 ppm), $^2\text{J H-2}_{\text{Man}} / \text{C-3}_{\text{Man}}$ (4,76 / 71,4 ppm), $^3\text{J H-2}_{\text{Man}} / \text{C-4}_{\text{Man}}$ (4,14 / 76,7 ppm), $^3\text{J H-4}_{\text{Gal}} / \text{C-2}_{\text{Gal}}$ (4,03 / 68,4 ppm), $^2\text{J H-3}_{\text{Man}} / \text{C-2}_{\text{Man}}$ (4,00 / 69,9 ppm), $^2\text{J H-5}_{\text{Gal}} / \text{C-6}_{\text{Gal}}$ (3,90 / 61,2 ppm), $^3\text{J H-6}_{\text{Gal}} / \text{C-4}_{\text{Gal}}$ (3,77 / 69,3 ppm), $^3\text{J H-5}_{\text{Man}} / \text{C-3}_{\text{Man}}$ (3,76 / 71,4 ppm).

As atribuições dos sinais de LLSD podem ser resumidas na Tabela 24 (p. 98), que dá as correlações encontradas no espectro de HMQC (Figuras 72, 73 e 74, p. 131-133). A análise dos espectros de TOCSY e de HMBC não permitiu a observação de acoplamentos que pudessem relacionar os sinais de carbonos e de hidrogênios de H-6 / C-6 Man 6-SO₄ e de H-5 / C-5 Man 6-SO₄. É possível que existam outras posições substituídas por grupo sulfato, tanto em BRSD como em LLSD, em quantidades não detectáveis pela análise de RMN, sendo necessária ainda a realização posterior de análises de espectrometria de massas de derivados metilados dessas amostras.

Tabela 24: Atribuições das correlações ^1H - ^{13}C observadas no espectro de HMQC de LLSD:

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Atribuição
100,1	4,76	C-1 / H-1 Man
99,9	4,76	C-1 / H-1 Man
98,8	5,03	C-1 / H-1 Gal
76,7	3,87	C-4 / H-4 Man
75,0	3,55	C-5 / H-5 Manns
73,4	3,76	C-5 / H-5 Mans
72,9	3,68	C-5 / H-5 Man 6-SO ₄
71,4	3,82	C-3 / H-3 Man
71,3	3,90	C-5 / H-5 Gal
71,2	4,00	C-3 / H-3 Manns
69,9	4,14	C-2 / H-2 Man
69,4	3,94	C-3 / H-3 Gal
69,3	4,03	C-4 / H-4 Gal
68,4	3,85	C-2 / H-2 Gal
66,7	4,21	C-6 / H-6 Man 6-SO ₄
66,5	3,98 / 3,83	C-6 / H-6 Mans
61,1	3,77	C-6 / H-6 Gal
60,5	3,93 / 3,77	C-6 / H-6 Manns

5. CONCLUSÕES:

- Os rendimentos das galactomananas purificadas de sementes de *Cassia fastuosa*, *Mimosa scabrella* e de *Leucaena leucocephala* foram: 19,3%, 22,2% e 13,3%, e, a relação molar Man:Gal de 2,9, 1,1 e 1,4, respectivamente.
- Estudos de atividade antiviral dos derivados sulfatados, urônicos e urônico/sulfatados contra o HSV-1 mostraram que a propriedade é dependente da presença dos grupamentos sulfato e que a oxidação por si só não promove atividade antiviral. Os derivados de galactomanana de *L. leucocephala* apresentaram atividade similar aos derivados de *M. scabrella* em valores mais baixos de DS (LL-S:0,60, LLOS:0,33, BR-S:1,4, BROS:0,8). Os derivados testados apresentaram inibição de 50% das UFPs nas concentrações de 0,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para BR-S e 14,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para BROS, inibição de 77 % na concentração de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para LL-S e inibição de 60,5 % na concentração de 3,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para LLOS, com melhores resultados que os derivados de galactomanana de *C. fastuosa*, menos substituída. CFS (DS: 0,22) e CFOS (DS: 0,30) promoveram, respectivamente, 91 e 94% de inibição nas concentrações de 1131 e 1218 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- Os derivados sulfatados BRS e LLS utilizados nos experimentos de atividade antiviral contra arbovírus apresentaram M_w de 620 kDa (BRS) e 574 kDa (LLS) e perfis homogêneos de eluição pelo HPSEC-MALLS; o aparecimento de banda de estiramento axial de S=O em torno de 1250 cm^{-1} no infravermelho para BRS e LLS confirmam a presença de sulfato nas moléculas; os derivados BRS e LLS apresentaram, respectivamente, 15,3 e 14,3% de sulfato por dosagem com BaCl_2 .
- Nos experimentos *in vitro*, para o dengue 1, as concentrações capazes de reduzir em 100 vezes o título viral foram de 347 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BRS) e de 37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LLS) e para o vírus da febre amarela selvagem foram de 1055 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (BRS) e de 386 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (LLS). Obteve-se melhor resposta com o derivado LLS, de *L. leucocephala*.
- Nos experimentos *in vivo*, abaixo de 5 mg.mL^{-1} (244 mg.kg^{-1}), BRS e LLS não foram letalmente tóxicos e LLS apresentou proteção média de 96,5%, enquanto BRS apresentou 87,8% contra o YFV quando inoculados com 1 mL de solução a 1 mg.mL^{-1} simultaneamente à inoculação do vírus.
- Quando inoculados simultaneamente à inoculação do YFV em camundongos jovens adultos (via intraperitoneal), permitiram o desenvolvimento de resposta imune contra o vírus semelhante à produzida por inoculação de YFV inativado por formaldeído,

induzindo índices de neutralização de 3,3 (BRS) e 3,7 (LLS) nos soros de camundongos. A observação dessa resposta de desenvolvimento de anticorpos neutralizantes somada à baixa atividade antiviral *in vitro*, ausência de atividade antiviral em camundongos recém-nascidos e boa resposta antiviral *in vivo* em animais jovens-adultos, parecem indicar que a ação antiviral esteja sendo exercida por um mecanismo imunoestimulatório.

- A determinação da atividade anticoagulante dos derivados BRS e LLS mostrou potência de LLS duas vezes maior que a de BRS, indicando que BRS apresentaria menor efeito adverso anticoagulante que LLS.
- A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e 2D de BR, BRS, LL e de LLS, levou ao assinalamento parcial dos hidrogênios e carbonos dos polissacarídeos nativos e dos derivados sulfatados de *M. scabrella* e de *L. leucocephala*. As melhores condições de análise, para melhor resolução dos sinais a 50°C , foram resultado de obtenção de amostras de mais baixa massa molecular por meio de oxidação com $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cu}^{++}$; a análise dos espectros indica que BRS foi preferencialmente sulfatado em C-6 Gal ($\delta^{13}\text{C}$: 67,5 ppm, $\delta^1\text{H}$: 4,21 ppm) e LLS em C-6 Man ($\delta^{13}\text{C}$: 66,7 ppm, $\delta^1\text{H}$: 4,21 ppm).
- A análise comparativa das estruturas químicas de BRS e de LLS, frente às respostas antivirais *in vitro* e *in vivo* contra YFV (BeH111) e DEN-1 (Hawaii), parece indicar que galactomananas sulfatadas preferencialmente em C-6 Man, ou seja, menos substituídas por galactose, apresentam melhor resposta antiviral contra esses arbovírus. Esses resultados indicam que a galactomanana sulfatada de *Cassia fastuosa*, por ser menos substituída, poderia ser uma candidata em potencial para estudos posteriores de atividade antiviral contra esses arbovírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

AGRAWALL, P.K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochem.**, v. 31(10), p. 3307-3330, 1992.

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

AMORNRUT, 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.

BERNLIND, C.; OSCARSON, S.; WIDMALM, G. Synthesis, NMR, and conformational studies of methyl α -D-mannopyranoside 2-, 3-, 4-, and 6-monophosphates. **Carbohydr. Res.**, v. 263, p. 173-180, 1994.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acid. **Anal. Biochem.**, v. 54, p. 484-489, 1973.

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

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde, 1996. Resolution no. 196/96 on research involving human subjects. Disponível em <http://conselho.saude.gov.br/docs/Resolucoes/reso_196_english.doc> acesso em 10 outubro 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica: Dengue (CID-10 A90)** Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/PDF/GVE0504.pdf>> acesso em 26 setembro 2000^a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica: Febre Amarela (CID-10 A95)**. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/PDF/GVE0511.pdf>> acesso em 26 setembro 2000^b.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica – volume I**. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/pub/pdfs/guia_vig_epi_vol_1.pdf> acesso em 26 novembro 2003^a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Boletim epidemiológico**. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/pub/pdfs/boletim_epi_edicao_especial.pdf> acesso em 26 novembro 2003^b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico**. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/pub/boletim_eletronico_epi/boletim_eletronico_epi_0201> acesso em 26 novembro 2003^c.

BRUMMER, Y.; CUI, W.; WANG, Q. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 229-236, 2003.

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.

BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R.; ROCHA, D.C.; DIETRICH, S.M. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. **Phytochem.**, v. 38 (4), p. 871-875, 1995.

BURKART, A. Leguminosas mimosoideas. In: REITZ, P.R. **Flora ilustrada catarinense**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodriguez, p. 179-185, 1979.

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

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

CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Res.**, v. 43, p. 93-102, 1999.

CHAUBEY, M.; KAPOOR, V.P. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. **Carbohydr. Res.**, v. 332, p. 439-444, 2001.

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

CONTIN, L.F. Anatomia foliar da *Cassia fastuosa* Willd. **Bol. Mus. Bot. Mun.**, n. 12, 1974.

CONTRERAS, R.L.; KAMERLING, J.P.; BREG, J.; VLIAGENTHART, J.F.G. ¹H- and ¹³C-N.M.R. spectroscopy of synthetic monosulphated methyl- α -D-galactopyranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 179, p. 411-418, 1988.

DAAS, P.J.H.; SCHOLS, H.A.; JONGH, H.H.J. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. **Carbohydr. Res.**, v. 329, p. 609-619, 2000.

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

DAVIS, A.L.; HOFFMANN, R.A.; RUSSEL, A.L.; DEBET, M. ^1H - and ^{13}C -NMR characterization of the digalactosylmannopentaose liberated from legume seed galactomannan by β -mannanase action. **Carbohydr. Res.**, v. 271, p. 43-54, 1995.

DEA, I.C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 31, p. 241-312, 1975.

de NOOY, A.E.J., BESEMER, A.C.; van BEKKUM, H. Highly selective TEMPO mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas**, v. 113, p. 165-166, 1994.

de NOOY, A.E.J., BESEMER, A.C.; van BEKKUM, H. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydr. Res.**, v. 269, p. 89-98, 1995.

de NOOY, A.E.J., BESEMER, A.C., van BEKKUM, H.; van DIJK, J.A.P.P.; SMITH J.A.M. TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on the dimensions of the obtained polyelectrolyte chains. **Macromol.**, v. 29, p. 6541-6547, 1996.

DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 35, p. 341-376, 1978.

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.

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 (106), p. 106 -109, 1962.

DOUGLAS Jr., R.G. Fármacos antivirais. In: GILMAN, A.G., RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**, 8^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 784-797, 1991.

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; GONÇALVES, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; CERESO, 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.

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

DULBECCO, R.; GINSBERG, H.S. A natureza dos vírus. In: DULBECCO, R. e GINSBERG, H.S. **Microbiologia de Davis – Virologia**, v. 4, 2^a ed., São Paulo: Harper & Row do Brasil, p.1221 - 1261 , 1980^a.

DULBECCO, R.; GINSBERG, H.S. Os herpesvírus. In: DULBECCO, R. e GINSBERG, H.S. **Microbiologia de Davis – Virologia**, v. 4, 2^a ed., São Paulo: Harper & Row do Brasil Ltda, p. 1477-1497, 1980^b.

EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. **Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 70 p., (Documentos, 20) 1988.

EO, S.-K., KIM, Y.-S., LEE, C.-K.; HAN, S.-S. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses. **J. Ethnopharmacol.**, v. 72, p. 475–481, 2000.

FABROWSKI, F.J. **Abordagem anatômica, químico-qualitativa e botânica da bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) e suas variedades populares**. Curitiba, 1998. Dissertação (mestrado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, 87 p., UFPR.

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

FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A.; ROTT, R.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D O. Herpesviridae. In: FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A.; ROTT, R.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D O. **Veterinary virology**, 2nd ed., Academic Press, p. 337-368, 1993.

FISCHBACH, D.P.; FOGDALL, R.P. In: **Coagulación**, Buenos Aires: Editora Panamericana, p. 14-264, 1985.

FLEXNER, C.; BARDITCH-CROVO, P.A.; KORNHAUSER, D.M.; FARZADEGAN, H.; NERHOOD, L.J.; CHAISSON, R.E.; BELL, K.M.; LORENTSEN, K.J.; HENDRIX, C.W.; PETTY, B.G.; LIETMAN, P.S. Pharmacokinetics, toxicity and activity of intravenous dextran sulfate in human immunodeficiency virus infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, p. 2544–2550, 1991.

GANEM, B. Biological spin labels as organic reagents. Oxidation of alcohols to carbonyl compounds using nitroxyls. **J. Org. Chem.**, v. 40 (13), p. 1998-2000, 1975.

GANTER, J.L.M.S. **Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga)**. Curitiba, 1988. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, 135 p., UFPR.

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, 126 p., UFPR.

GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O., RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17 (1), p. 13-19, 1995.

GANTER, J.L.M.S.; CARDOSO, A.T.M.; KAMINSKI, M.; REICHER, F. Galactomannan from seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process. **Int. J. Microbiol.**, v. 21, p. 137-140, 1997.

GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Mimosaceae* spp. **Biores. Technol.**, v. 68, p. 55-62, 1999.

GERMANO, S. **Heparinóides Produzidos por Modificação Química em Galactomananas de Sementes de *Cassia fastuosa* Willd. e *Mimosa scabrella* Benth.** Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, 84 p., UFPR.

GONZÁLEZ, 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.

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

GORDON, M.; DEEKS, S.; MARZO, C.; GOODGAME, J.; GURALNIK, M.; LANG, W.; MIMURA, T.; PEARCE, D.; KANEKO, Y. Curdlan sulfate (CRDS) in a 21-day intravenous tolerance study in human immunodeficiency virus (HIV) and cytomegalovirus (CMV) infected patients: indication of anti-CMV activity with low toxicity. **J. Medicine**, v. 28 (1), p. 108-128, 1997.

GORIN, P.A.J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 38, p. 13-104, 1981.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, v. 53, p. 1212-1223, 1975.

GRASDALEN, H.; PAINTER, T. N.M.R. studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans. **Carbohydr. Res.**, v. 81, p. 59-66, 1980.

GUBLER, D.J., KUNO, G., SATHER, G.E., VELEZ, M.; OLIVER, A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 158-165, 1984.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 480–496, 1998.

GUZMÁN, M.G.; KOURÍ, G. Dengue: an update. **The Lancet**, v. 2, p. 33-42, 2002.

HAN, S.B., KIM, Y.H., LEE, C.W., PARK, S.M., LEE, H.Y., AHN, K.S., KIM, I.-H.; KIM, H.M. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. **Immunopharmacol.**, v. 40, p. 39–48, 1998.

HARTREE, E.F. Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HEINZ, F.X.; ALISSON, S.L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 450-455, 2001.

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

IBRAHIM, J.; GRIFFIN, P.; COOMBE, D.R.; RIDER, C.C.; JAMES, W. Cell-surface heparan sulfate facilitates human immunodeficiency virus type 1 entry into some cell lines but not primary lymphocytes. **Virus Res.**, v. 60, p. 159-169, 1999.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 40, p. 531–544, 1978.

IRINODA, K.; MASIHI, K.N.; CHIHARA, G.; KANEKO, Y.; KATORI, T. Stimulation of microbicidal host defence mechanisms against aerosol influenza virus infection by lentinan. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 14 (6), p. 971-977, 1992.

JOLY, A.B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**, 12^a ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, p. 371-382, 1998.

JOSHI, H.; KAPOOR, V.P. *Cassia grandis* Linn. f. seeds galactomannan: structural and cristallographical studies. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 1907-1912, 2003.

JOUAULT, S.C.; CHEVOLOT, L.; HELLEY, D.; RATISKOL, J.; BROS, A.; SINQUIN, C.; ROGER, O.; FISCHER, A.-M. Characterization, chemical modifications and *in vitro* anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1528, p. 141-151, 2001.

KERÉKGYÁRTÓ, C.; VIRÁG., L.; TANKÓ, L.; CHIHARA, G.; FACHET, J. Strain differences in the cytotoxic activity and TNF production of murine macrophages stimulated by lentinan. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 18 (6/7), p. 347-353, 1996.

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

KRAMBECK, R. **Presença de compostos antracênicos em folhas de *Cassia fastuosa* Willd.** Curitiba, 1984. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), área de Botânica, Curso de pós-graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, 84 p., UFPR.

LALITHA, K.; VARGHEESE, C.M.; BALASUBRAMANIAN, N. Spectrophotometric determination of mimosine and 3-hydroxy-4-(1H)-pyridone – the toxic principles of *Leucaena leucocephala*. **Anal. Biochem.**, v. 213, p. 570-62, 1993.

LEAL, A.C. **Efeito de resíduos de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit na fertilidade de dois solos agrícolas das regiões norte e noroeste do Paraná, com particular ênfase no pH e alumínio.** Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, 97 p., UFPR.

LEYSSSEN, P.; de CLERCQ; NEYTS, J. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13 (1), p. 67-82, 2000.

LIMA, P.C.F. **Comportamento de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit comparado com *Prosopis juliflora* (SW) DC e *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume em Petrolina (PE), região semi-árida do Brasil.** Curitiba, 1982. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Setor de Ciências Agrárias, 96 p., UFPR.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, v. 1, 2^a ed., Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 1998.

LUSH, R.M.; FIGG, W.D.; PLUDA, J.M.; BITTON, R.; HEDLEE, D.; KOHLER, D.; REED, E.; SARTOR, O.; COOPER, M.R. A phase I study of pentosan polysulfate sodium in patients with advanced malignancies. **Ann. Oncol.**, v. 7, p. 939–944, 1996.

MAJCZAK, G.A.H. **Polissacarídeos Sulfatados de *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Phaeophyta) – Estrutura Química e Atividade Biológica.** Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, 108 p., UFPR.

MAJCZAK, G.A.H.; RICHARTZ, R.R.T.B.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D. Antiherpetic activity of heterofucans isolated from *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Phaeophyta). Cape Town: **Proc. 17th Int. Seaweed Symp.**, p. 169-174, 2001.

MANZI, A.; CERESO, A.S.; SHOOLERY, J.N. High resolution ¹³C-N.M.R. spectroscopy of galactomannans. **Carbohydr. Res.**, v. 148, p. 189-197, 1986.

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

McBRIDE, W.J.H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Micr. Infect.**, v. 2, p. 1041-1050, 2000.

McCLEARY, B. Modes of action of β -mannanase enzymes of diverse origins on legume seed galactomannans. **Phytochem.**, v. 18, p. 757-763, 1979^a.

McCLEARY, B. Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume-seed D-galacto-D-mannans. **Carbohydr. Res.**, v. 71, p. 205-230, 1979^b.

McCLEARY, B.; CLARK, A.H.; REES, D.A. The fine structures of carob and guar galactomannans. **Carbohydr. Res.**, v. 138, p. 237-260, 1985.

MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROITT, I.M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R.; ANDERSON, R.M. **Microbiologia Médica**, São Paulo: Ed. Manole, p. 30.1–30.16, 1995.

MONATH, T.P. Yellow fever and dengue – the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. **Virology**, v. 5, p. 133-145, 1994.

MONATH, T.P. Flaviviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Fields Virology**, 3rd ed., v.1, p. 961-1034, 1996.

MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQVIST, G. Immunity in neonates. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 87, p. 207–213, 2002.

MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. **Immunol. Lett.**, v. 89, p. 175-185, 2003.

MORETÃO, M.P.; ZAMPRONIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunol. Lett.**, v. 93, p. 189-197, 2004.

NARDELLA, A.; CHAUBET, F.; BOISSON-VIDAL, C.; BLONDIN, C.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydr. Res.**, v. 289, p. 201-208, 1996.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. *Leucaena – promising forage and tree crop for the tropics*, Washington: National Academy of Sciences, 115 p., 1977.

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.; ESTÉ, 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.; MEERBACH, A.; MCKENNA, P.; de CLERCQ, E. Use of the yellow fever virus vaccine strain 17D for the study of strategies for the treatment of yellow fever virus infections. **Antiviral Res.**, v. 30, p. 125–132, 1996.

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

ONO, L.; PRETO, A.A.; HAYASHI, Y.; SIERAKOWSKI, M.R. *In vitro* antiviral activity of sulfated polysaccharides from seeds of *Cassia fastuosa* against Herpes Simplex virus. **Virus Rev. Res.**, ANAIS do IXth National Meeting of Virology, v. 3 (1), p. 76-77, 1998.

ONO, L.; PRETO, A.A.; HAYASHI, Y.; SIERAKOWSKI, M.R. Determinação da toxicidade *in vitro* de polissacarídeo nativo e sulfatado de sementes de *C. fastuosa* pelo método do MTT. ANAIS do 7^o Evento de Iniciação Científica da UFPR (EVINCI), p. 137, 1999^a.

ONO, L.; PRETO, A.A.; HAYASHI, Y.; SIERAKOWSKI, M.R. Antiviral activity of sulphated polysaccharides from seeds of Brazilian native plants against Herpes Simplex virus. **Virus Rev. Res.**, ANAIS do 10th National Meeting of Virology and 2nd Mercosul Meeting of Virology, v. 4 (1), p. 94-95, 1999^b.

PATCHEN, M.L.; MacVITTIE, T.J.; SOLBERG, B.D.; D'ALESSANDRO, M.M.; BROOK, I. Radioprotection by polysaccharides alone and in combination with amino thiols. **Adv. Space Res.**, v. 12 (2), p. 233-248, 1992.

PETKOWICZ, C.L.O. **Polissacarídeos de Sementes de Leguminosae - Caesalpinoideae e Análise Conformacional de Galactomananas**. Curitiba, 1998^a. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, 165 p., UFPR.

PETKOWICZ, C.L.; SIERAKOWSKI, M.R.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpinaceae. **Phytochem.**, v. 49 (3), p. 737-743, 1998^b.

PIRES, L.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. An active heparinoid obtained by sulphation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydr. Polym.**, v. 46, p. 165-169, 2001.

RAMESH, H.P.; YAMAKI, K.; ONO, H.; TSUSHIDA, T. Two-dimensional NMR spectroscopic studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan without chemical fragmentation. **Carbohydr. Polym.**, v. 45, p. 69-77, 2001.

RAMESH, H.P.; YAMAKI, K.; TSUSHIDA, T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydr. Pol.**, v. 50, p. 79-83, 2002.

RICARDI, S.M.H. **Familias de dicotiledóneas venezolanas II**, Merida: Universidad de los Andes, 1992.

ROIZMAN, B. Herpesviridae: a brief introduction. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Virology**, 2nd ed., New York: Raven Press, p. 1787-1793, 1990.

ROIZMAN, B.; SEARS, A.E. Herpes Simplex viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Virology**, 2nd ed., New York: Raven Press, p. 1787-1793, 1990.

SÁ, J.P.G. **Leucena – Utilização na alimentação animal**, Londrina: IAPAR, circular n^o 96, 1997.

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

SANDER, D.M. Antiviral drugs. **Course BS224: virology lecture notes**. Disponível em: <www.tulane.edu/~dmsander/WWW/224/224Virology.html> acesso em: 11 janeiro 2001.

SANO, Y. Antiviral activity of chondroitin sulfate against infection by tobacco mosaic virus. **Carbohydr. Polym.**, v. 33, p. 125-129, 1997.

SCOTT, J.E. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 38-44, 1965.

SEMELHACK, M.F.; CHUEN, S.C.; CORTES, DA. Nitroxyl mediated electrooxidation of alcohols to aldehydes and ketones. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 105, p. 4492-4494, 1983.

SHAUNAK, S.; THORNTON, M.; JOHN, S.; TEO, I.; PEERS, E.; MASON, P.; KRAUSZ, T.; DAVID, D.S. Reduction of the viral load of HIV-1 after the intraperitoneal administration of dextrin 2-sulphate in patients with AIDS. **AIDS**, v. 12, p. 399-409, 1998.

SHCHERBUKHIN, V.D. Galactomannans of native flora (review). **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 29, n. 6, p. 599-606, 1993.

SHOPE, R.E.; SATHER, G.E. Arboviruses. In: LENNETTE, E.H., SCHMIDT, N.J. (Eds.), **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections**, 5th ed., Baltimore American Public Health Association, p. 767-814, 1979.

SIDWELL, R.W.; HUFFMAN, J.H.; BARNARD, D.L.; SMEE, D.F.; WARREN, R.P.; CHIRIGOS, M.A.; KENDE, M.; HUGGINS, J. Antiviral and immunomodulating inhibitors of experimentally-induced Punta Toro virus infections. **Antiviral Res.**, v. 25, p. 105-122, 1994.

SIERAKOWSKI, M.R.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydr. Polym.**, v. 42, p. 51-57, 2000.

SIERAKOWSKI, M.R.; FREITAS, R.A.; FUJIMOTO, J.; PETRI, D.F.S. Adsorption behavior of oxidized galactomannans onto amino-terminated surfaces and their interaction with bovine serum albumin. **Carbohydr. Polym.**, v. 49, p. 167-175, 2002.

SILVA, B.P., TOSTES, J.B.; PARENTE, J.P. Immunologically active polysaccharides from *Centrosema pubescens*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 516–521, 2000.

SILVA, B.P.; PARENTE, J.P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 887–893, 2001.

SINGH, K.R.P. Cell culture derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). **Curr. Sci.**, v. 36, p. 506–508, 1967.

SMEE, D.F.; SIDWELL, R.W.; HUFFMAN, J.H.; HUGGINS, J.W.; KENDE, M.; VERBISCAR, A.J. Antiviral activities of tragacanthin polysaccharides on Punta Toro virus infections in mice. **Chemother.**, v. 42, p. 286–293, 1996.

SNOECK, R. Antiviral therapy of herpes simplex. **Int. J. Antimicrob. Ag.**, v. 16, p. 157-159, 2000.

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

SONI, S.K.; BOSE, S. Seed galactomannans & their structures. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 44, p. 544-547, 1985.

STUART, J.W.T.C.; BOUCHER, C.A.B.; COOPER, D.A.; GALASSO, G.J.; RICHMAN, D.D.; THOMAS, H.C.; WHITLEY, R.J. Summary of the III International Consensus Symposium on Combined Antiviral Therapy. **Antivir. Res.**, v. 38, p. 75-93, 1998.

TAVARES, G.A. **Estrutura e propriedades físico-químicas da galactomanana de *Cassia fastuosa* Willd.** Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

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

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

VIDAL, S.; GARCIA, M.; MONTERO, J.-L.; MORÈRE, A. Synthesis and biological evaluation of new mannose 6-phosphate analogues. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, p. 4051-4056, 2002.

WHISTLER, R.L. Introduction to industrial gums. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. **Industrial Gums – Polysaccharides and their derivatives**. Academic Press, 3rd ed., p. 1-19, 1993.

WHISTLER, R.L.; SMART, C.L. Galactomannans. In: WHISTLER, R.L.; SMART, C.L. **Polysaccharide Chemistry**, New York: Academic Press Inc., p. 292-301, 1953.

WHISTLER, R.L.; SPENCER, W.W. Preparation and properties of several polysaccharide sulfates. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 95, p. 36-41, 1961.

WHITLEY, R.J. Herpes Simplex viruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Virology**, 2nd ed., New York: Raven Press, p. 1843-1887, 1990.

WITVROUW, M.; de CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs, **Gen. Pharmac.**, v. 29 (4), p. 497-511, 1997.

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

WURZBURG, O.B. Converted starches. In: WURZBURG, O.B. **Modified starches: properties and uses**. Florida: CRC Press Inc., p. 17-40, 1986.

WYATT, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Anal. Chim. Acta**, v. 272, p. 1-40, 1993.

ANEXOS

A. Espectros bidimensionais da galactomanana nativa (BR), derivado sulfatado (BRS) e derivado sulfatado despolimerizado (BRSD) de sementes de *M. scabrella*

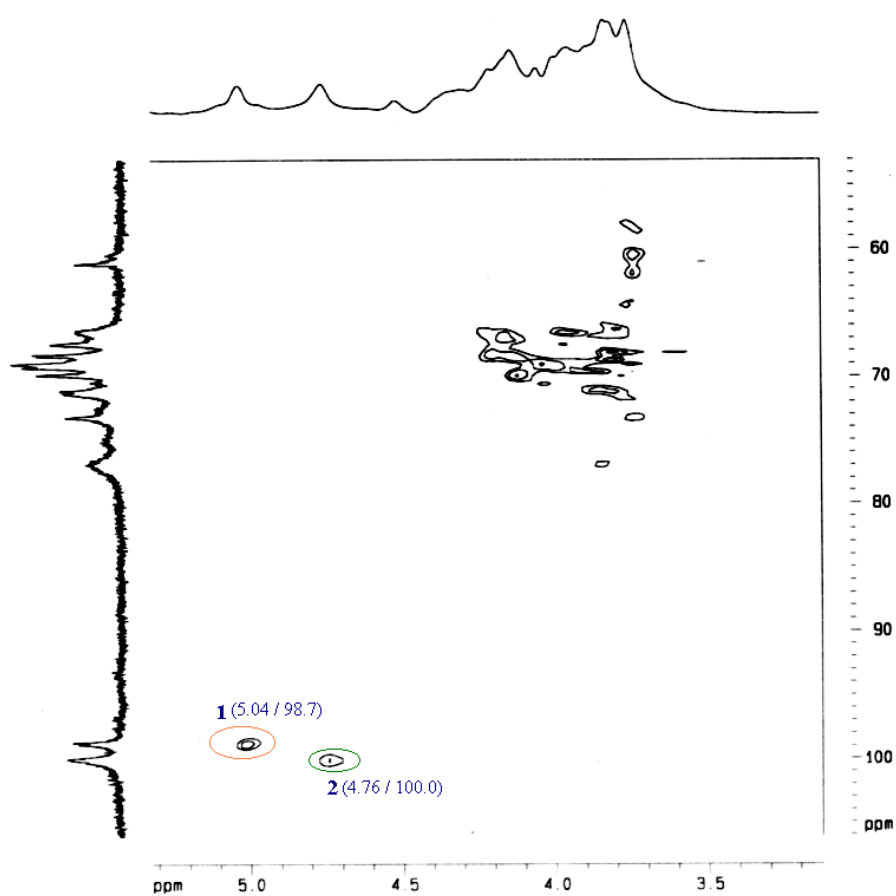
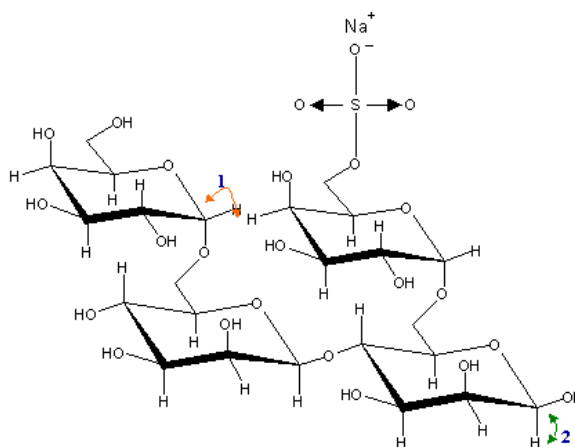


Figura 60: Espectro de ^1H - ^{13}C HMQC da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.



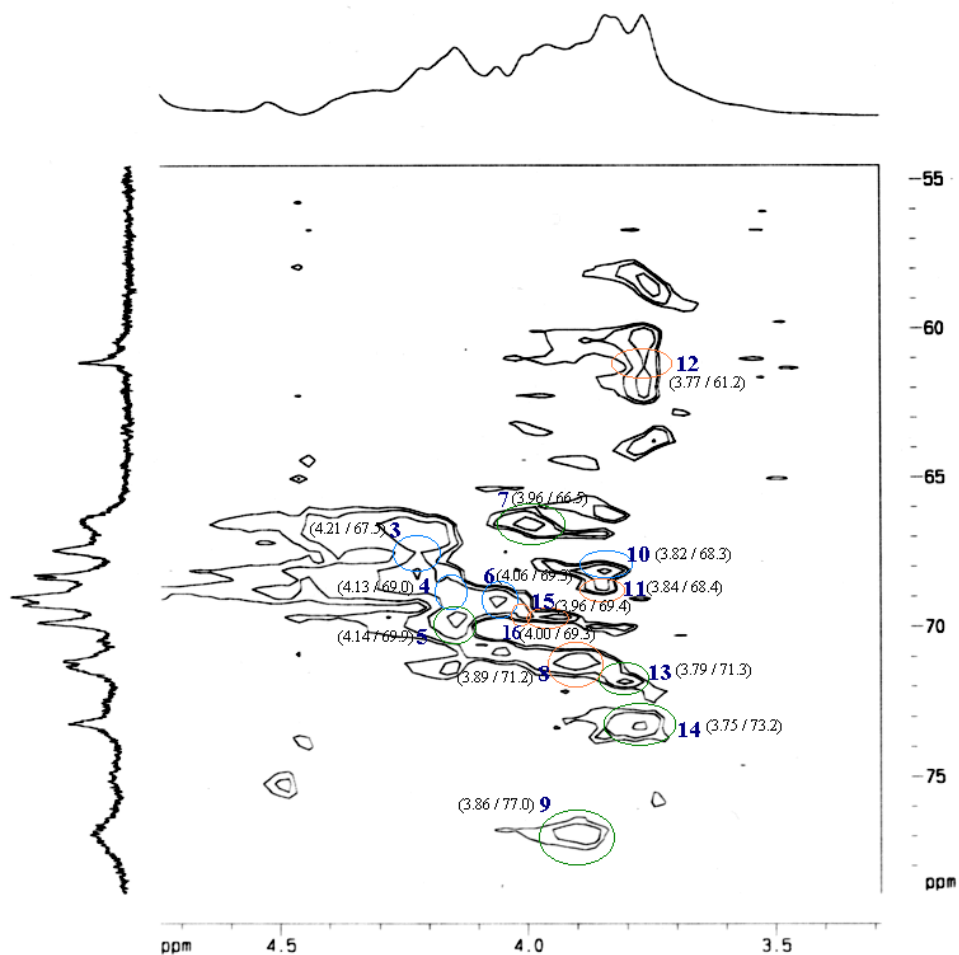
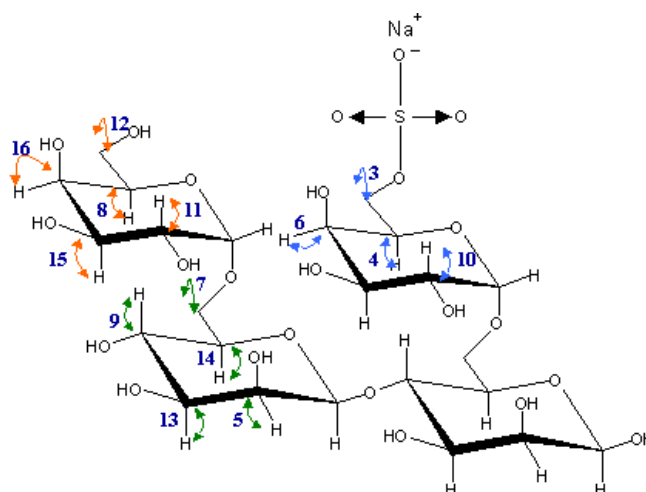


Figura 61: Expansão do espectro de HMQC da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.



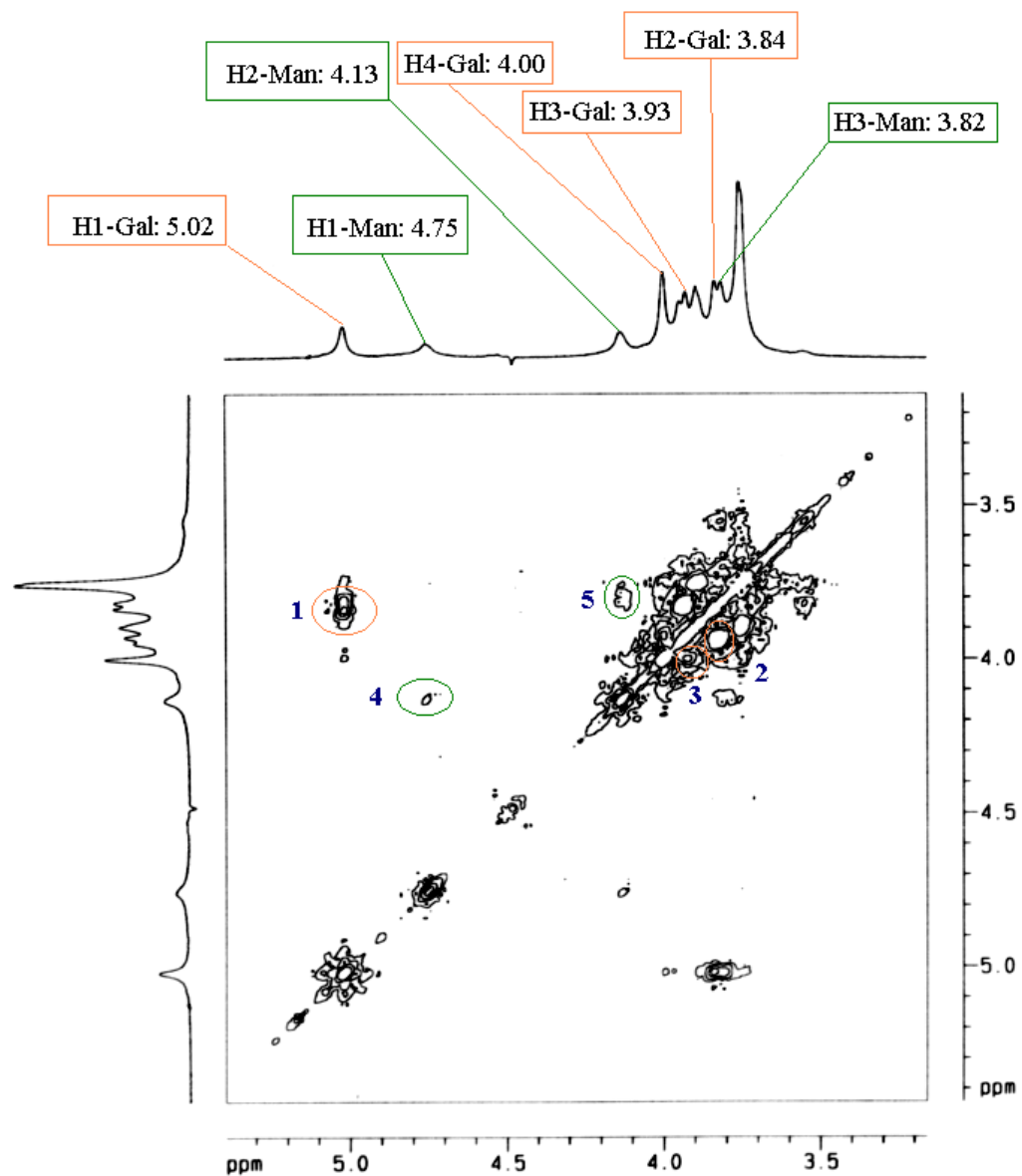
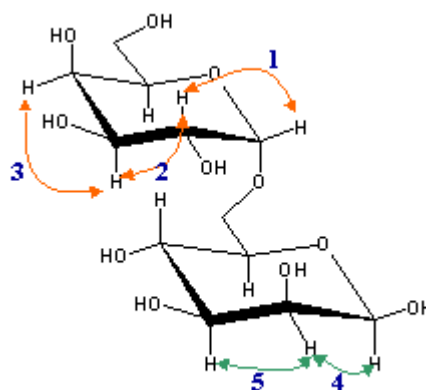


Figura 62: Espectro de ^1H - ^1H COSY da galactomanana nativa de sementes de *M. scabrella* (BR), $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , 500 MHz , com pré-saturação do HOD.



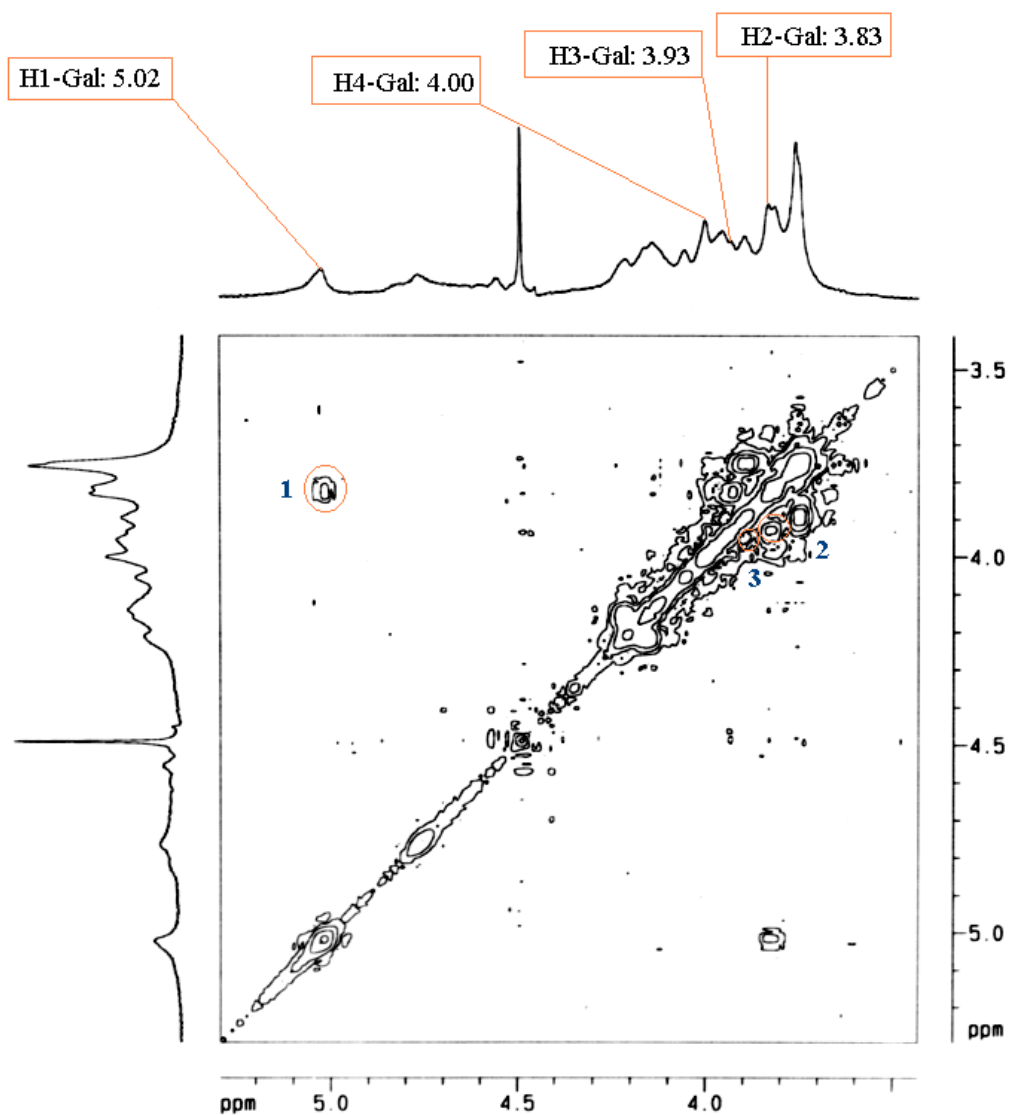
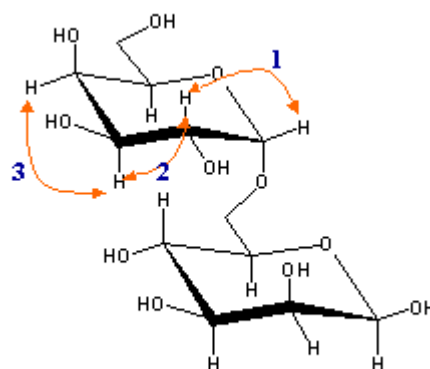


Figura 63: Espectro de ^1H - ^1H COSY da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação (BRS), $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , 500 MHz, com pré-saturação do HOD.



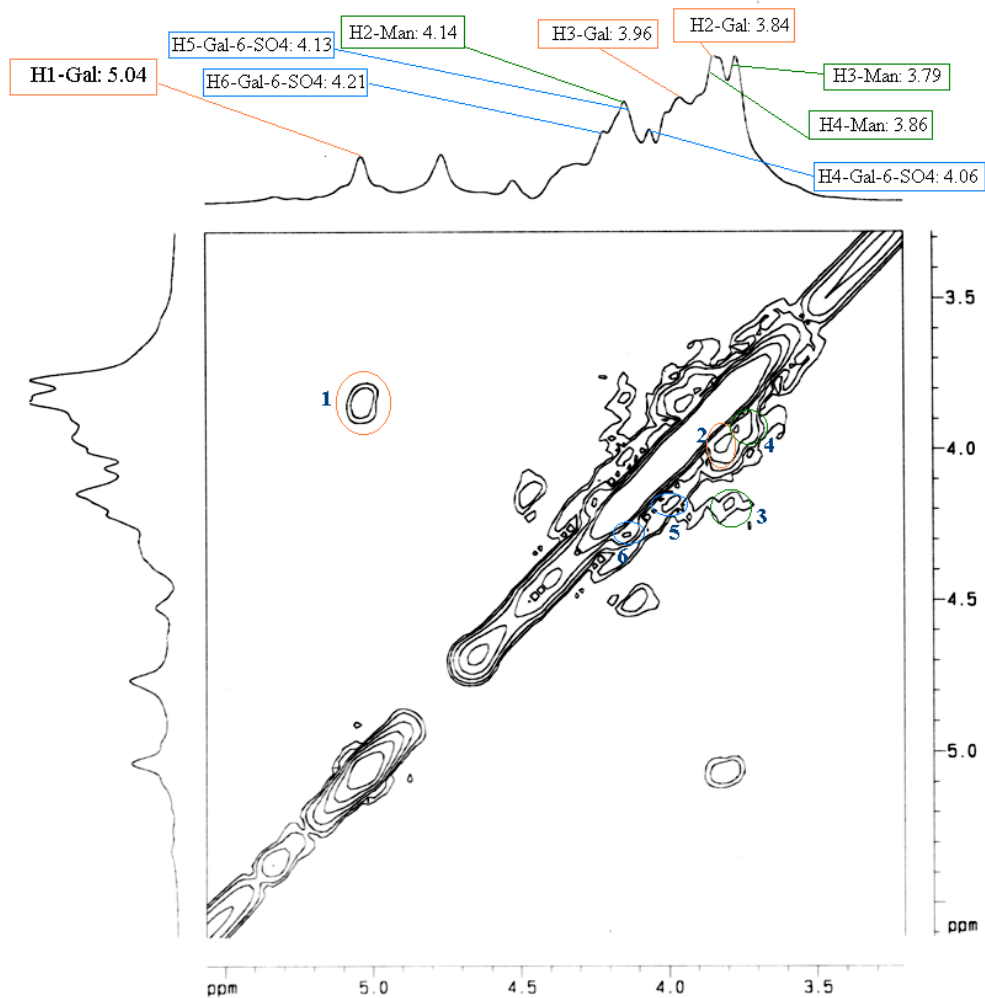
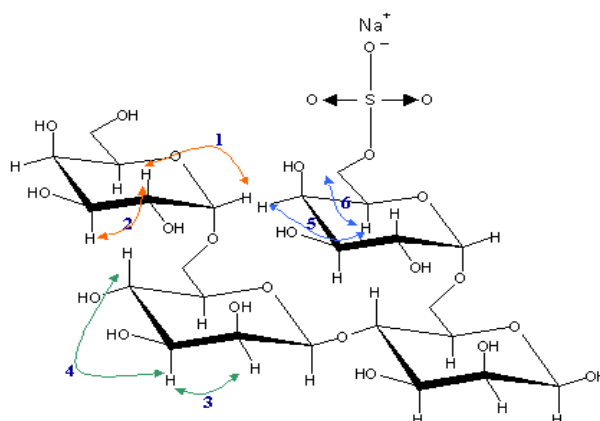


Figura 64: Espectro de ^1H - ^1H COSY da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , 400 MHz, com pré-saturação do HOD.



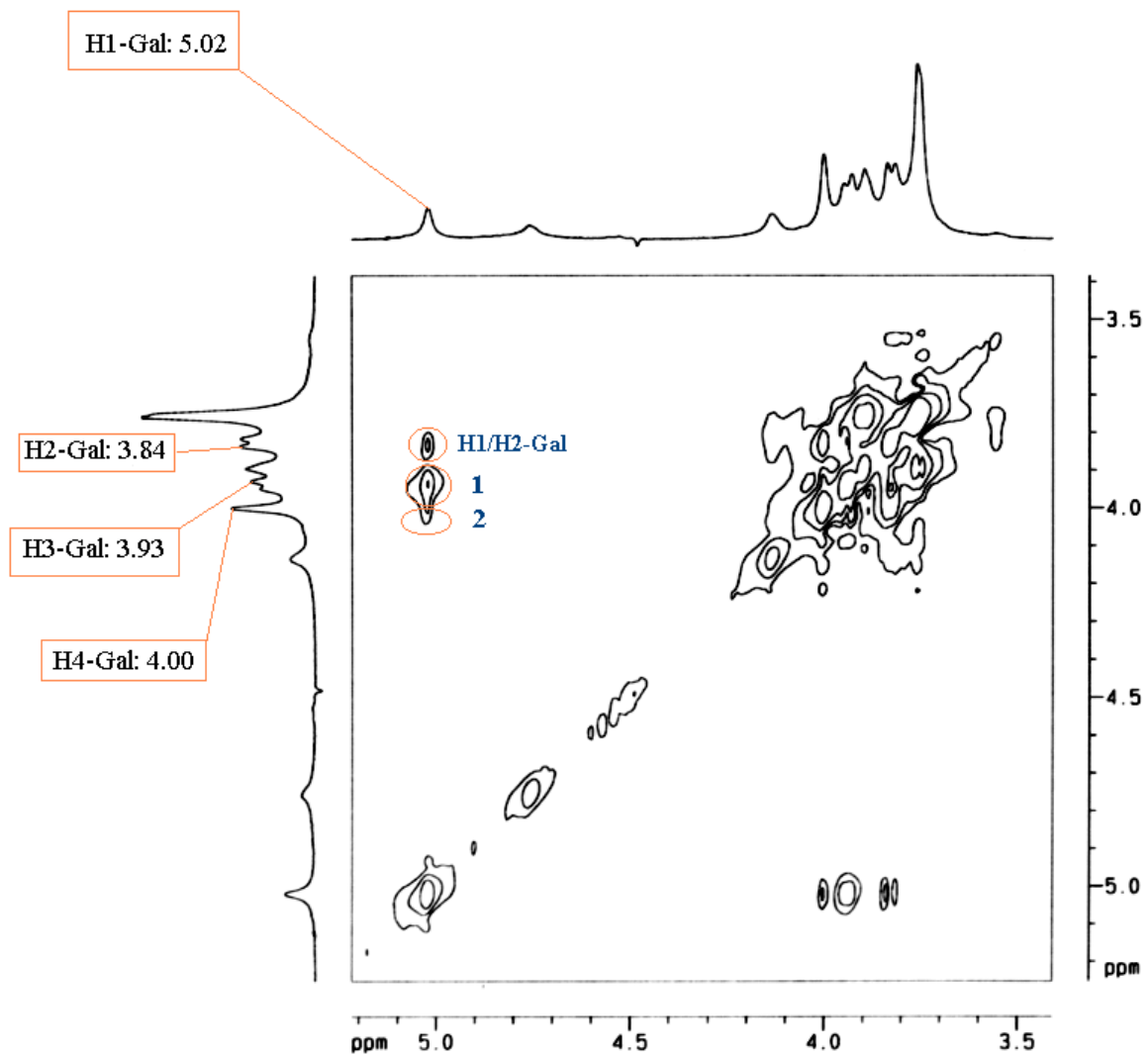
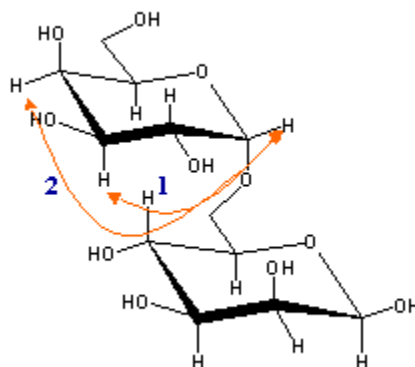


Figura 65: Espectro de TOCSY da galactomanana nativa de sementes de *M. scabrella* (BR), 20 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.



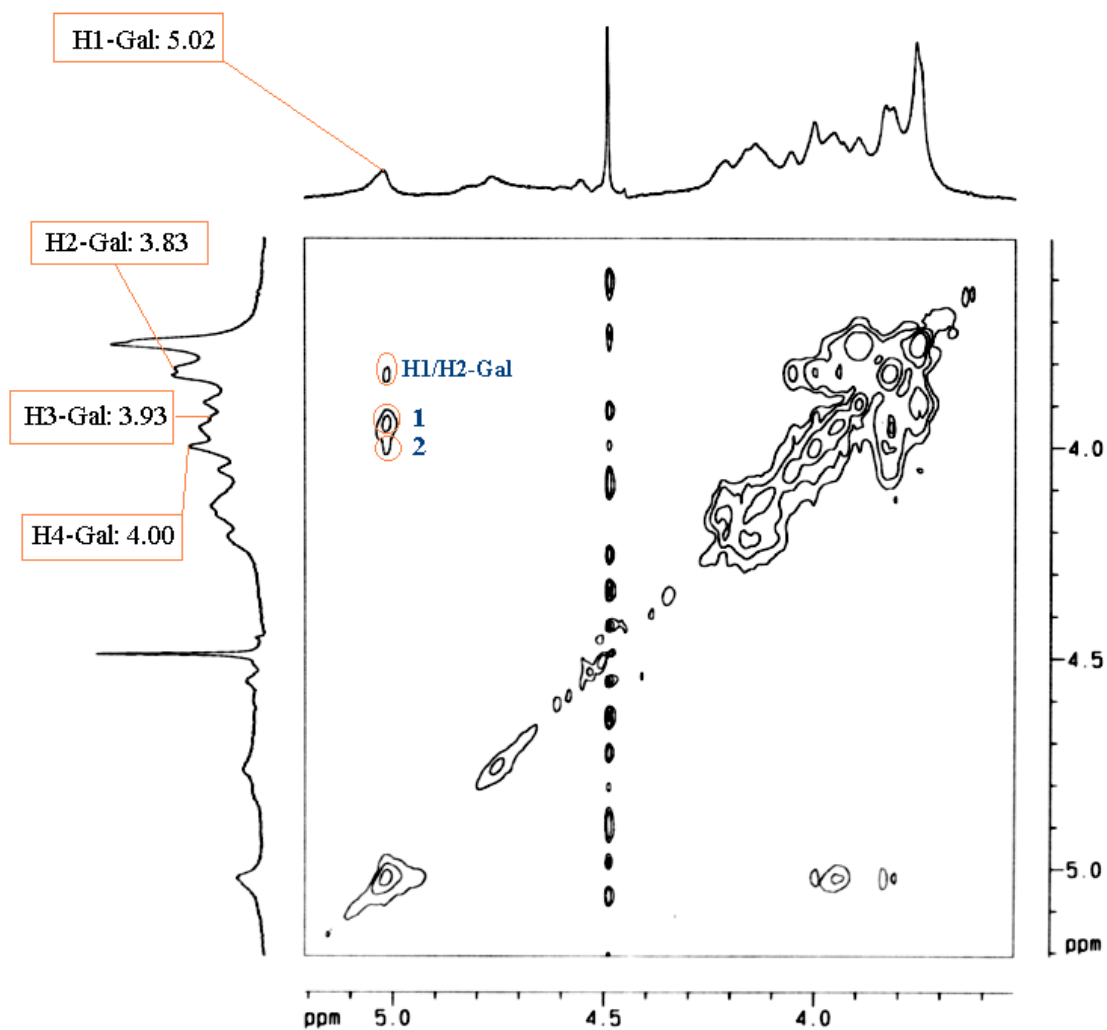
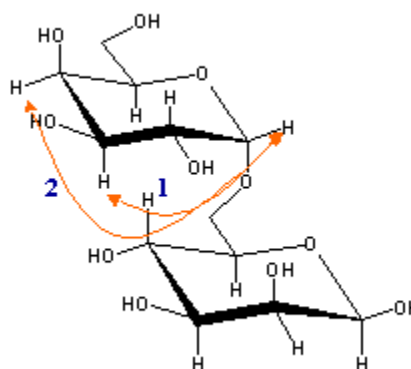


Figura 66: Espectro de TOCSY da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação (BRS), $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , 500 MHz, com pré-saturação do HOD.



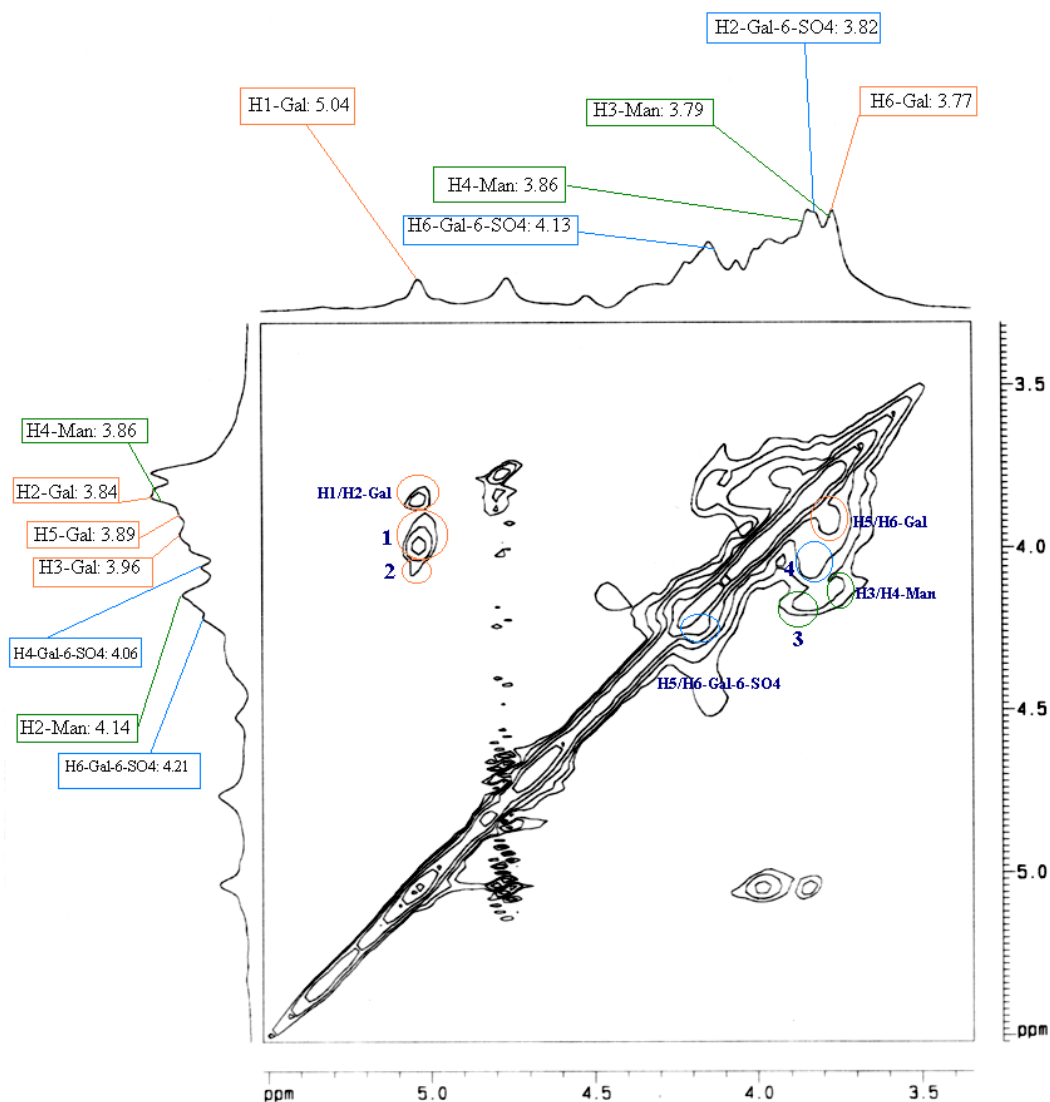
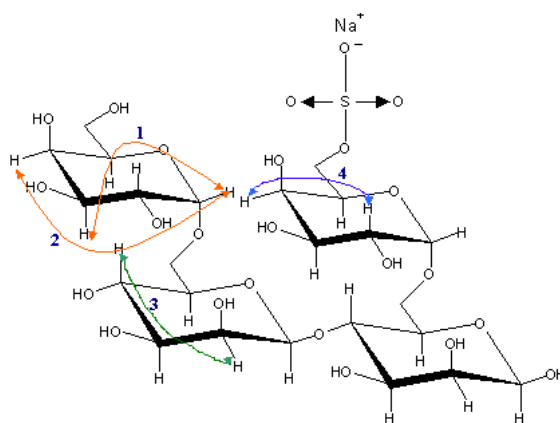


Figura 67: Espectro de TOCSY da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), 100 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 50°C, 400 MHz, com pré-saturação do HOD.



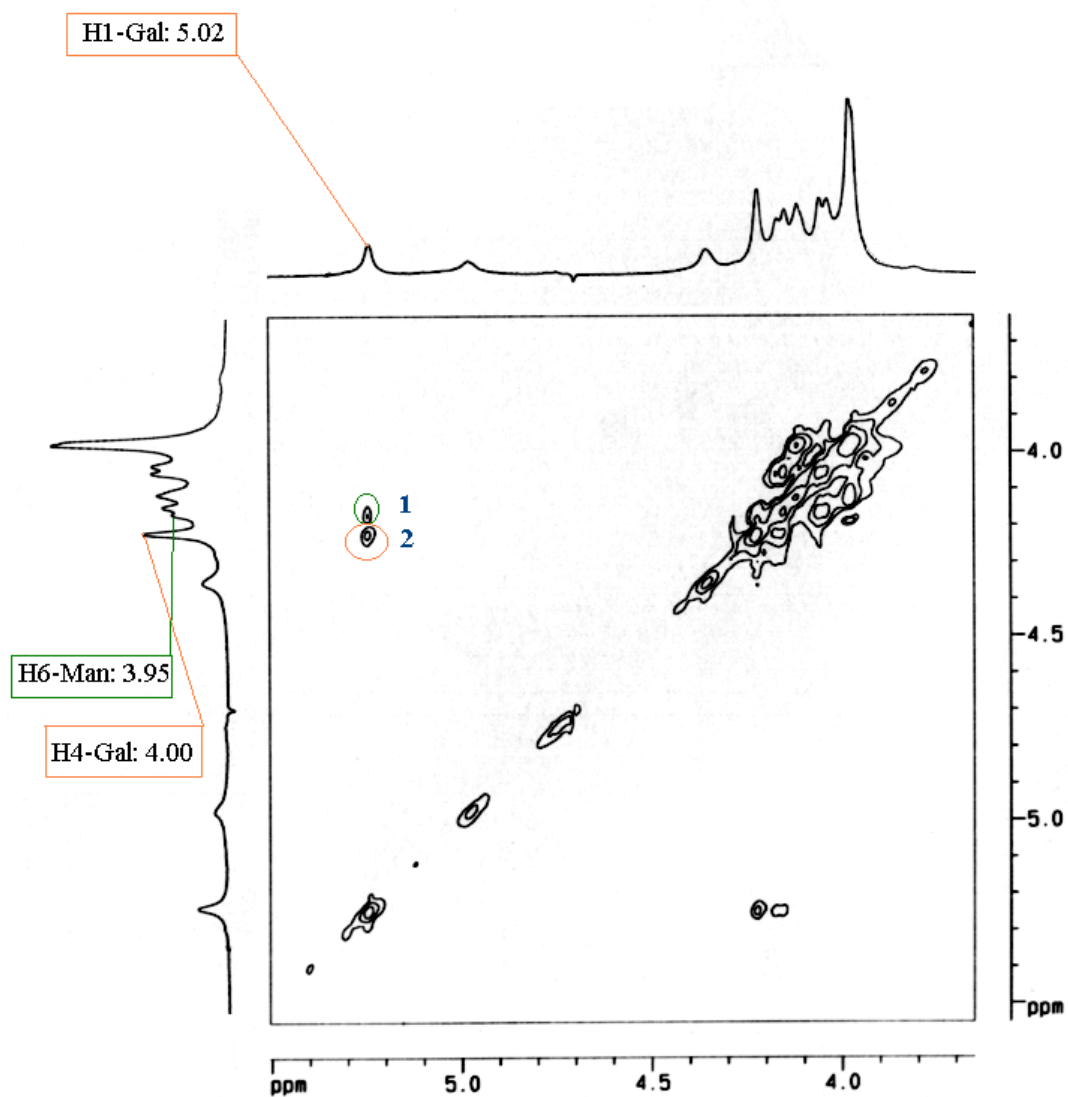
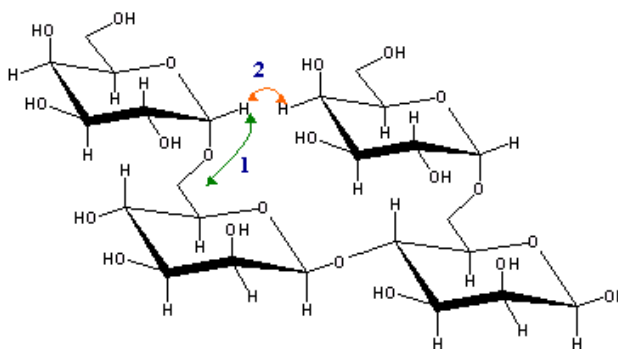


Figura 68: Espectro de ROESY da galactomanana nativa de sementes de *M. scabrella* (BR), 20 mg.mL⁻¹ em D₂O, a 50°C, 500 MHz, com pré-saturação do HOD.



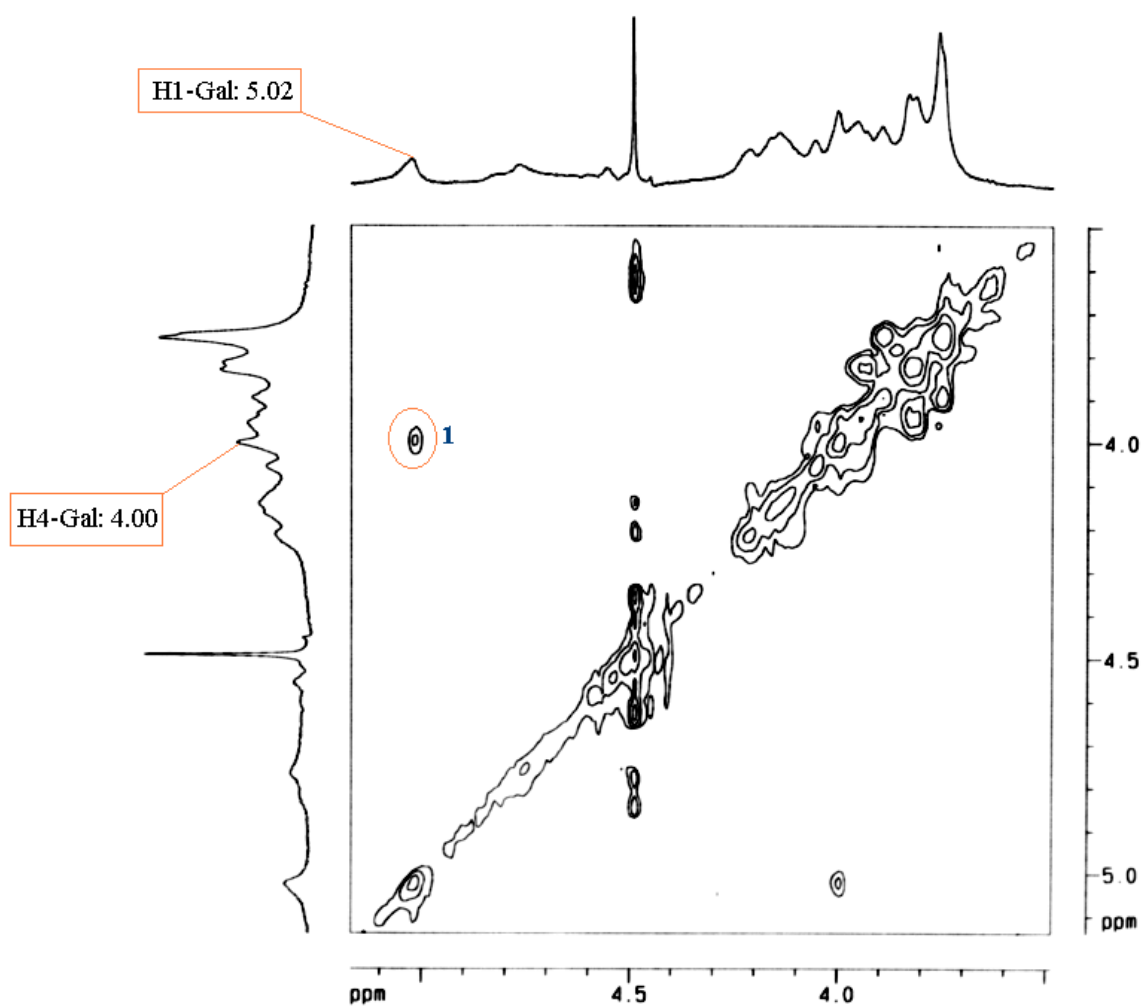
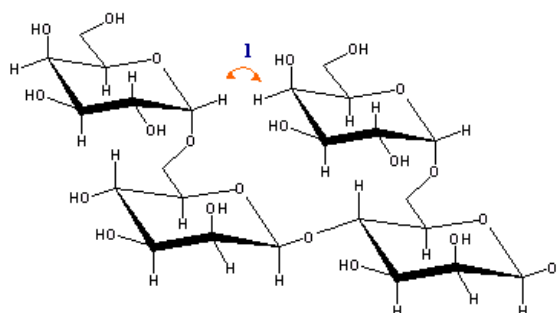


Figura 69: Espectro de ROESY da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação (BRS), $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , 500 MHz, com pré-saturação do HOD.



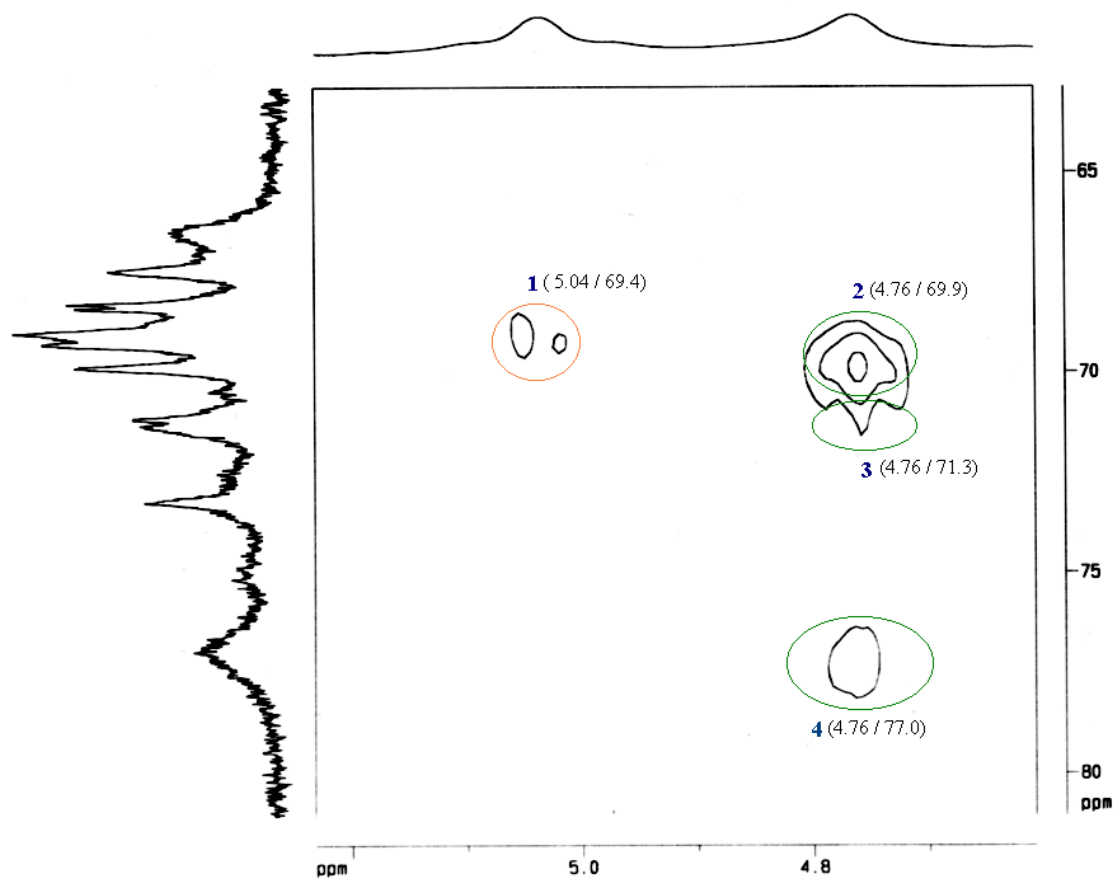
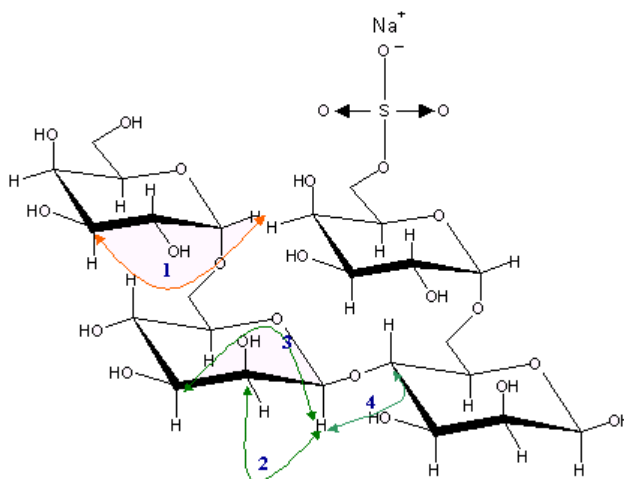


Figura 70: Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), $100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.



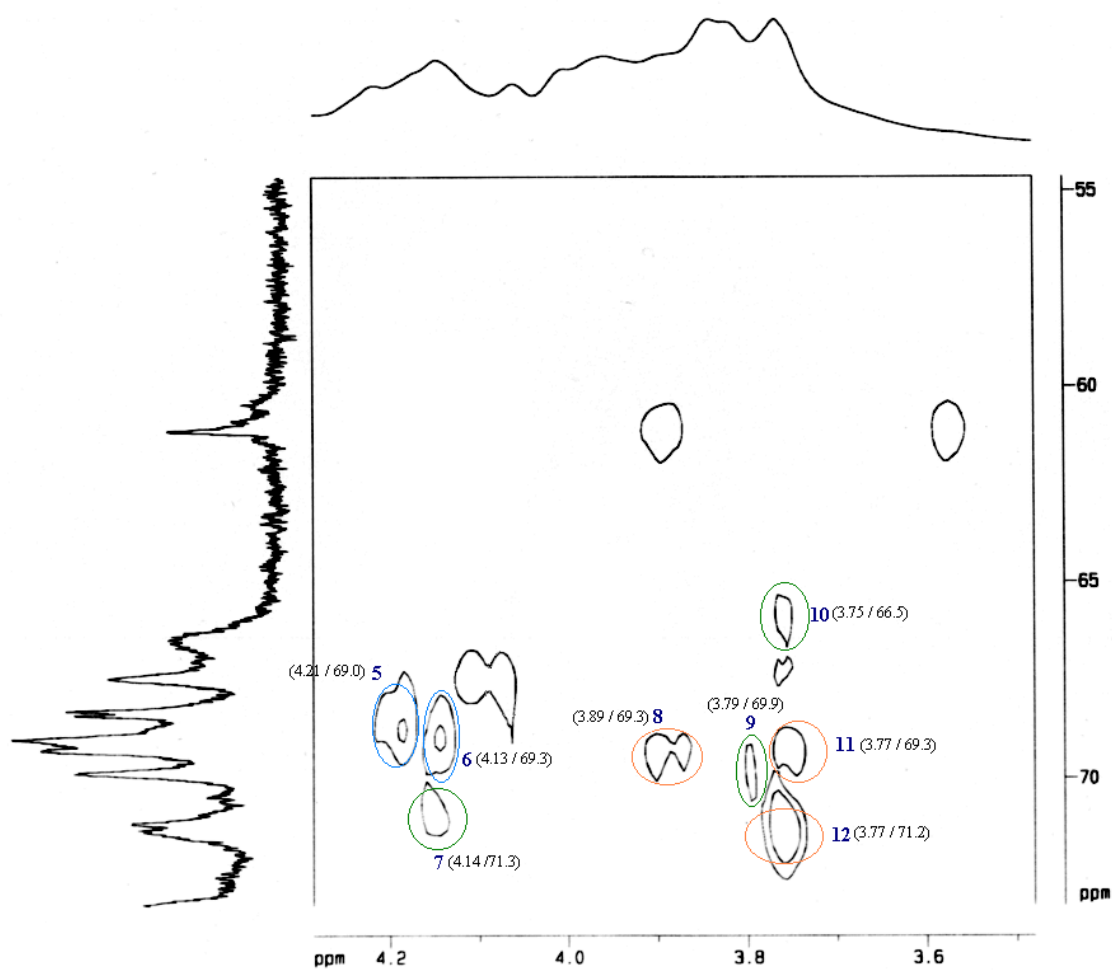
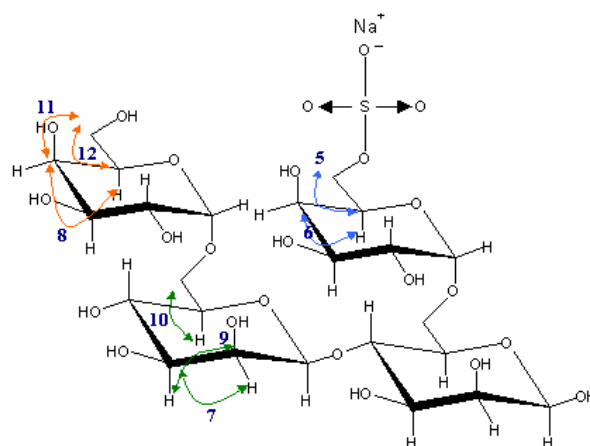


Figura 71: Expansão do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da galactomanana de sementes de *M. scabrella* modificada por sulfatação e despolimerizada (BRSD), $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.



B. Espectros bidimensionais da galactomanana nativa (LL), derivado sulfatado (LLS) e derivado sulfatado despolimerizado (LLSD) de sementes de *L. leucocephala*

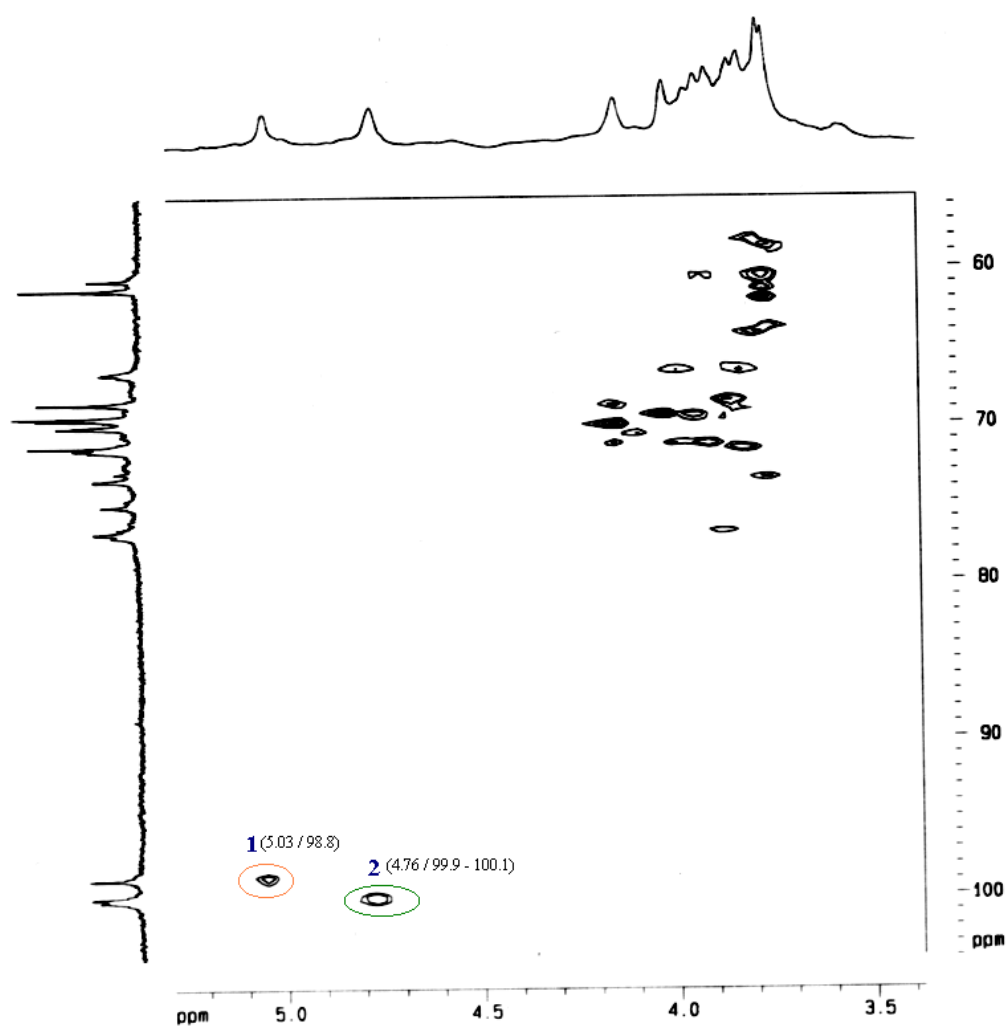
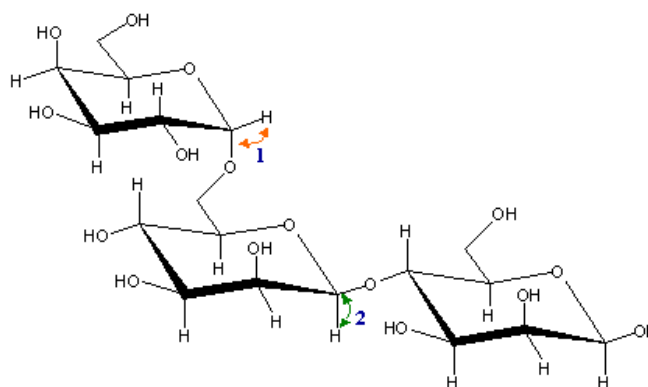


Figura 72: Espectro de ^1H - ^{13}C HMQC da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despimerizada (LLSD), $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.



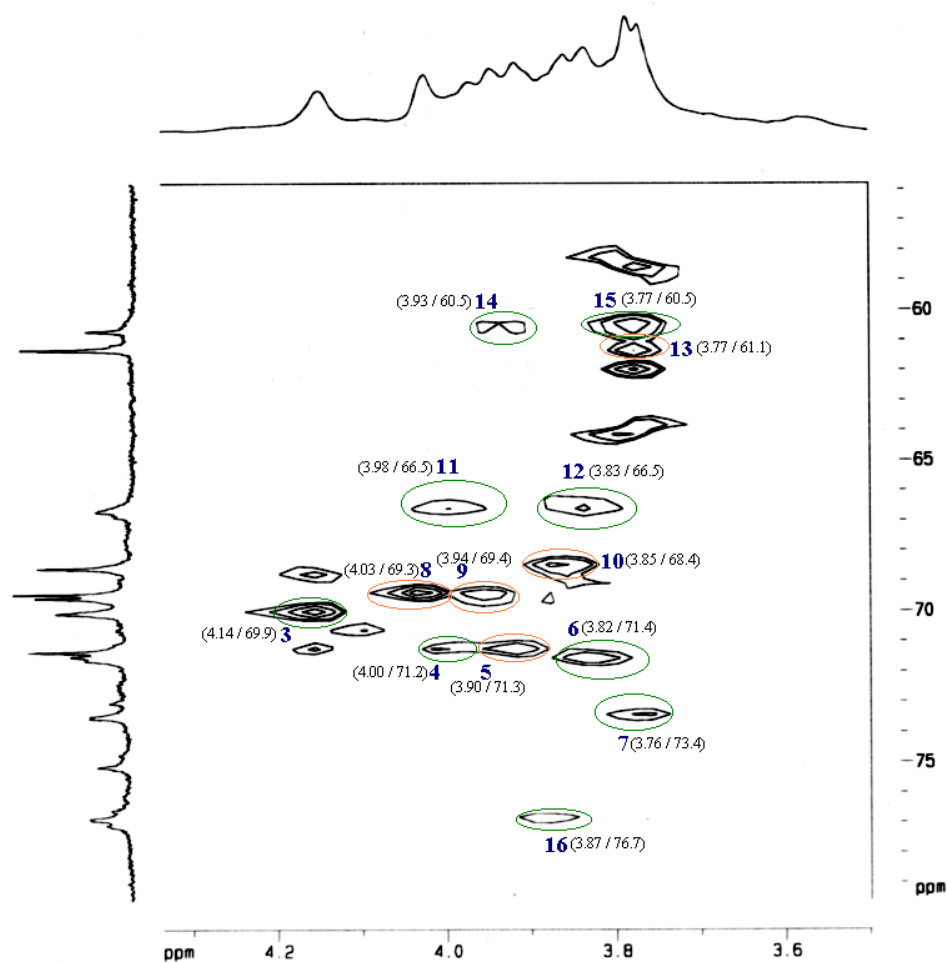
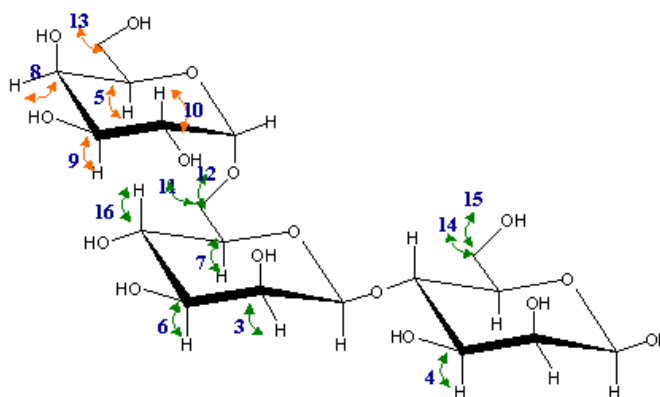


Figura 73: Expansão do espectro de ^1H - ^{13}C HMQC da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.



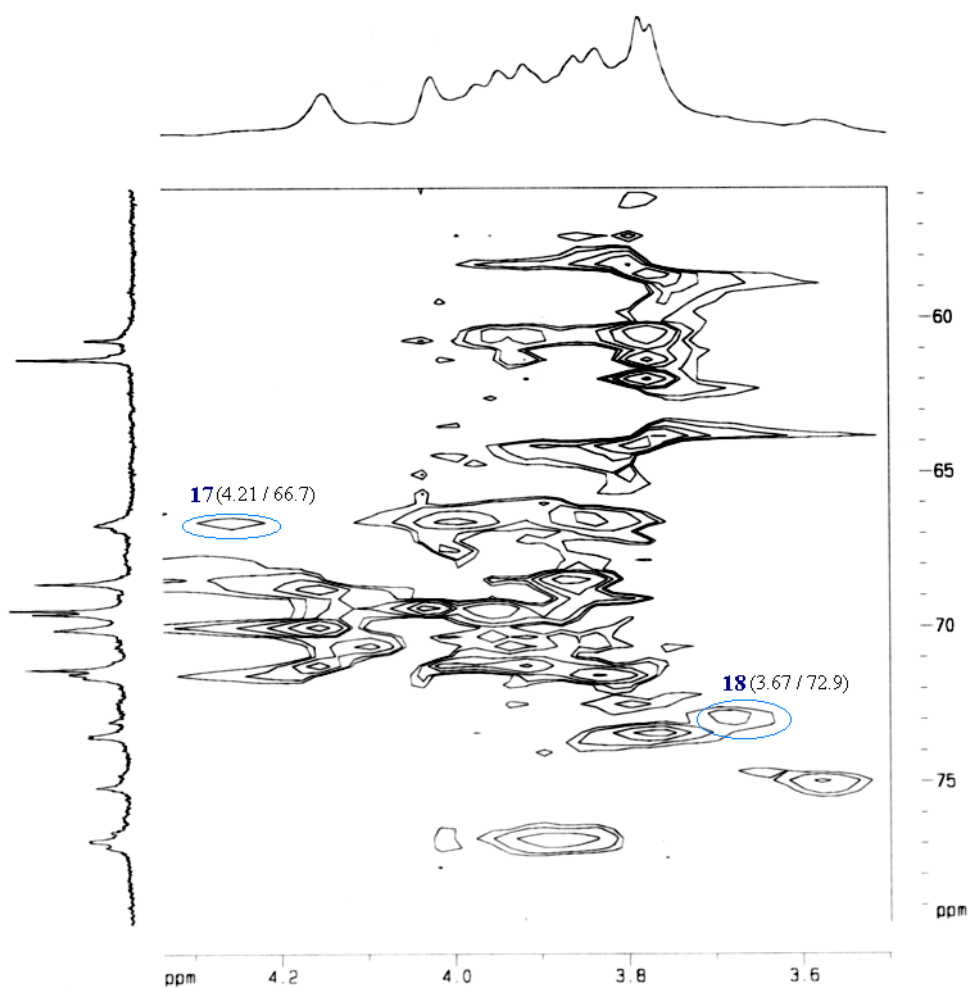
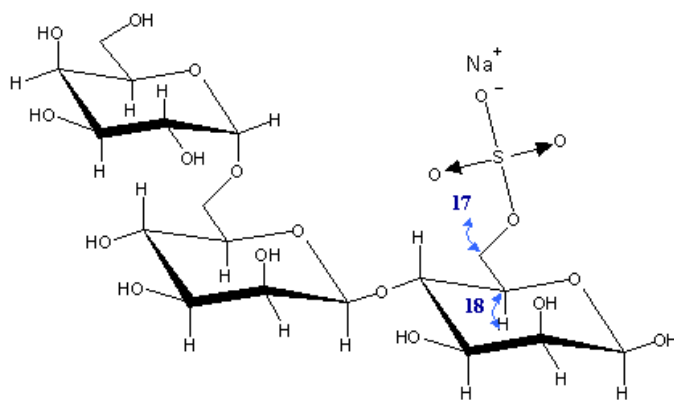


Figura 74: Expansão do espectro de ^1H - ^{13}C HMQC da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.



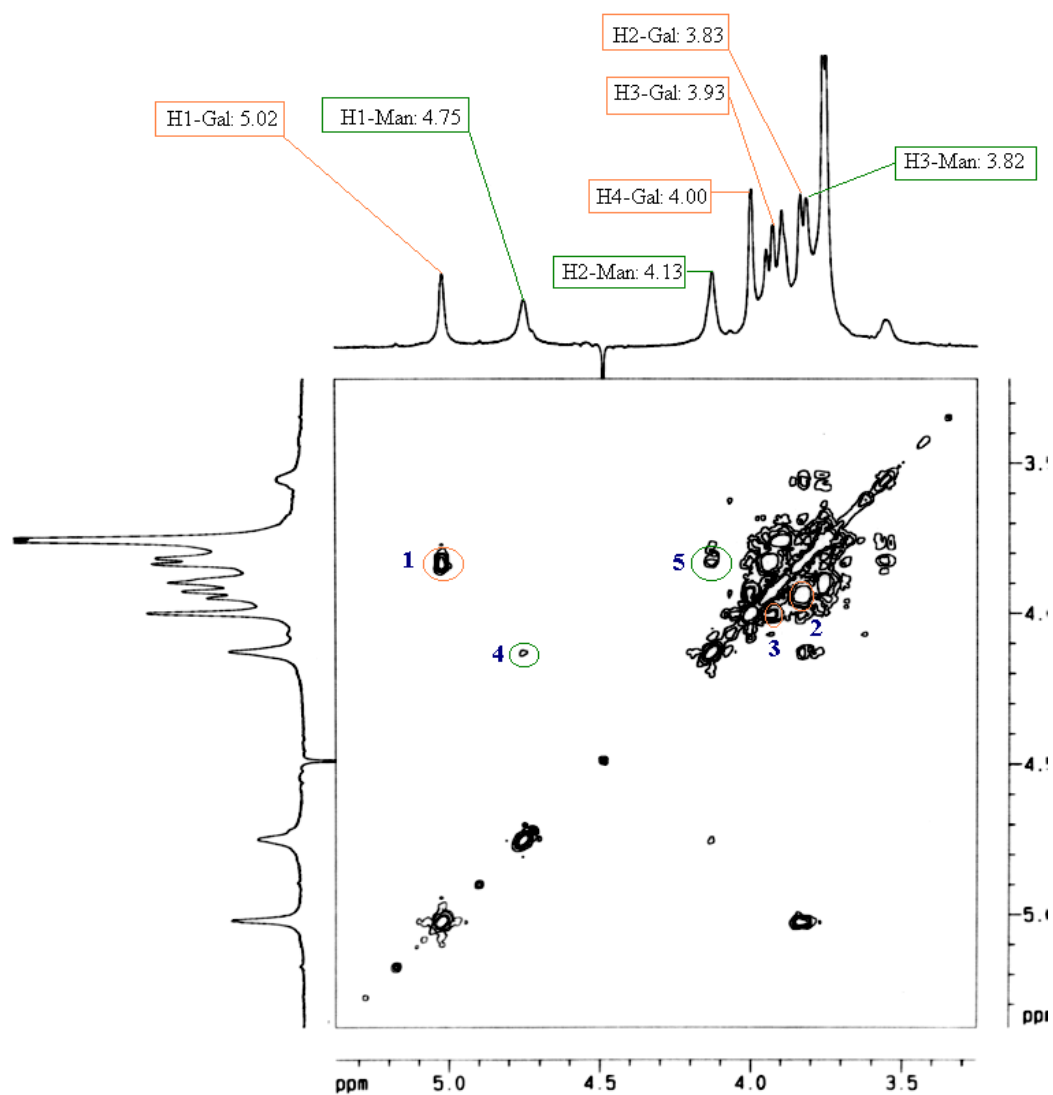
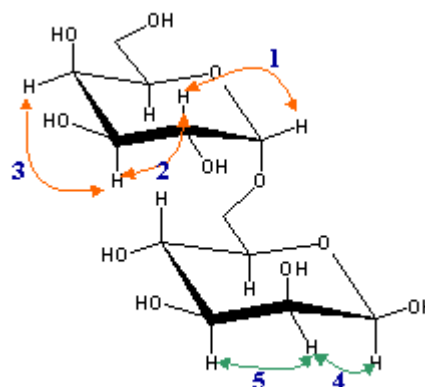


Figura 75: Espectro de ^1H - ^1H COSY da galactomanana nativa de sementes de *L. leucocephala* (LL), $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.



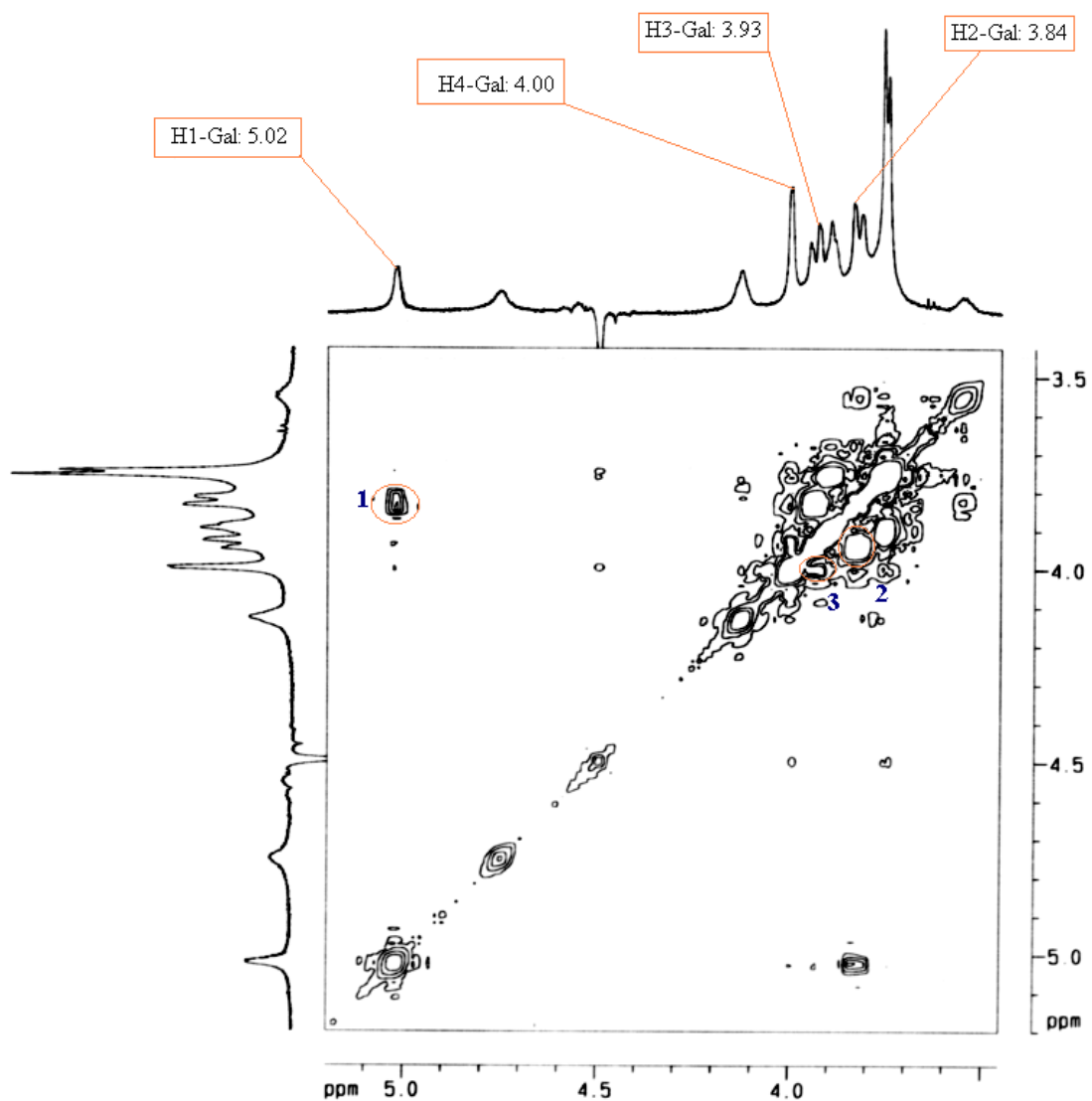
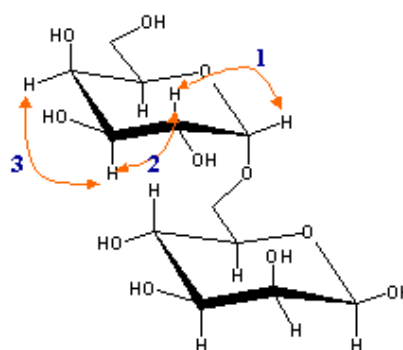


Figura 76: Espectro de ^1H - ^1H COSY da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação (LLS), $15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.



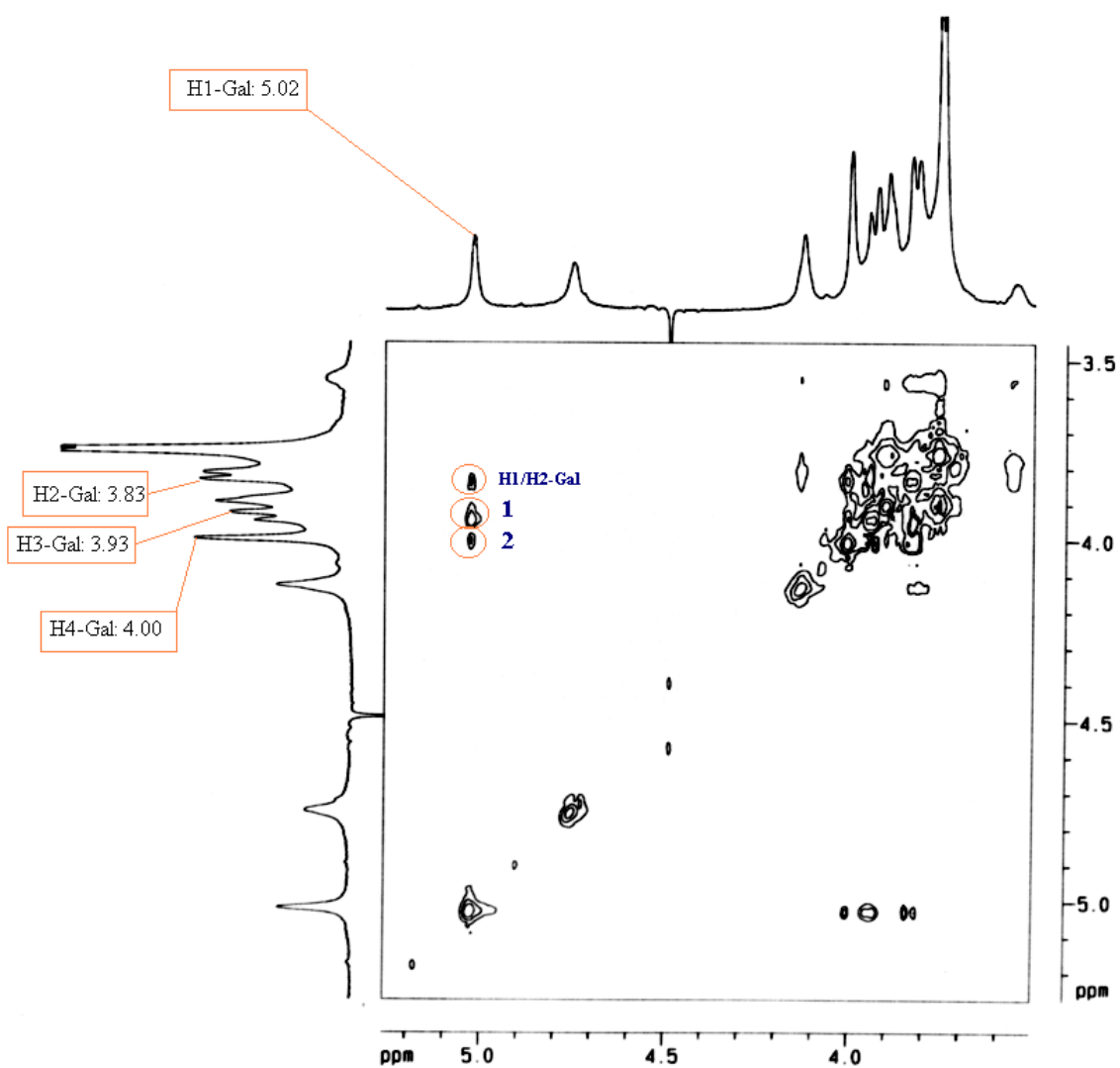
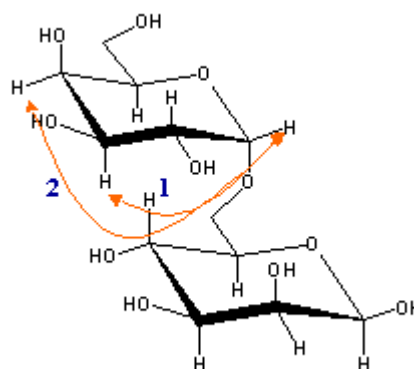


Figura 77: Espectro de TOCSY da galactomanana nativa de sementes de *L. leucocephala* (LL), $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.



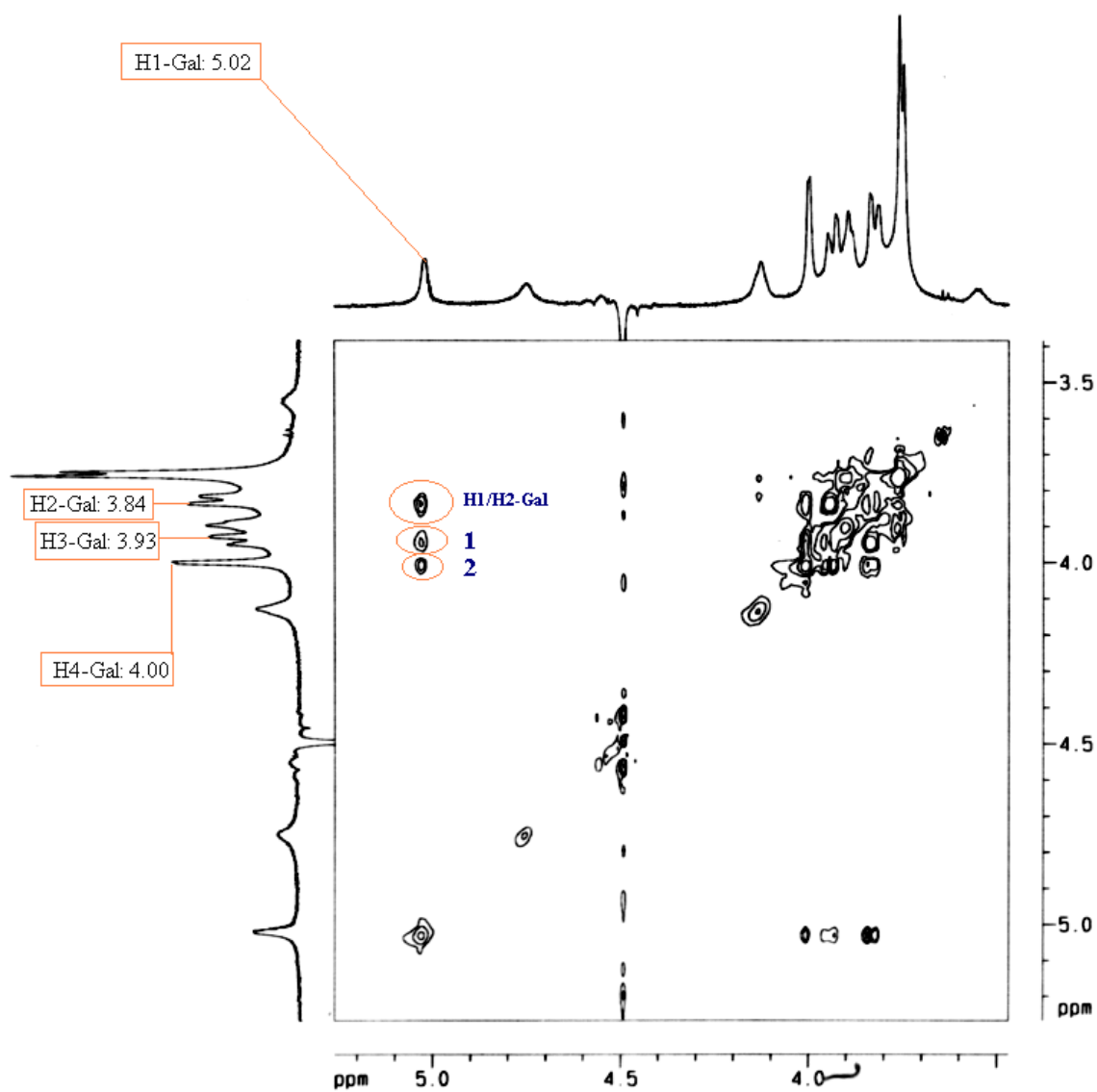
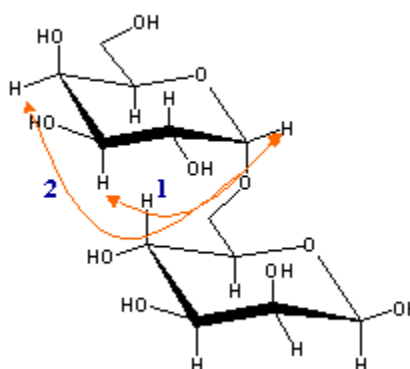


Figura 78: Espectro de TOCSY da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação (LLS), 15 mg.mL^{-1} em D_2O , a 50°C , (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.



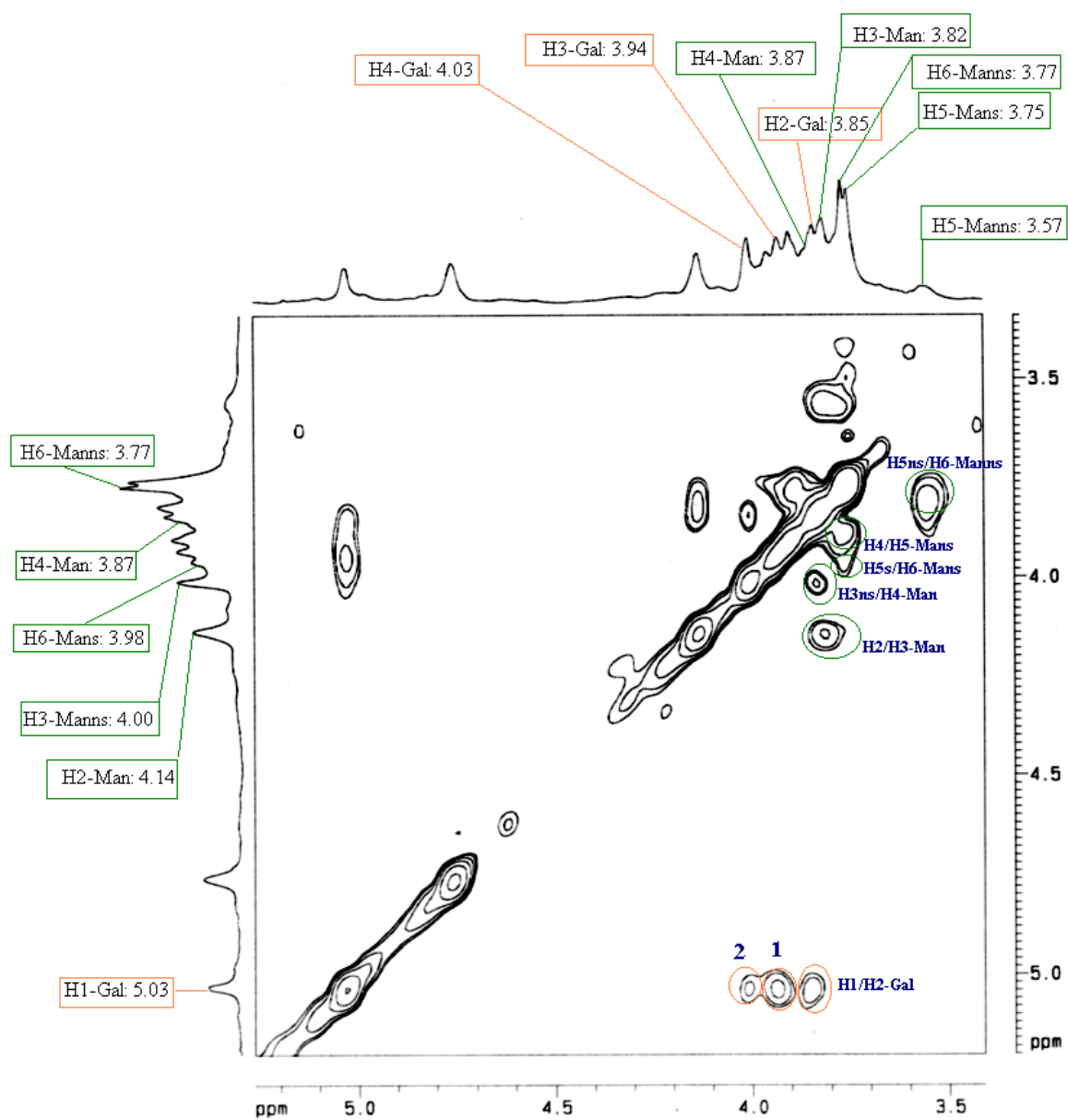
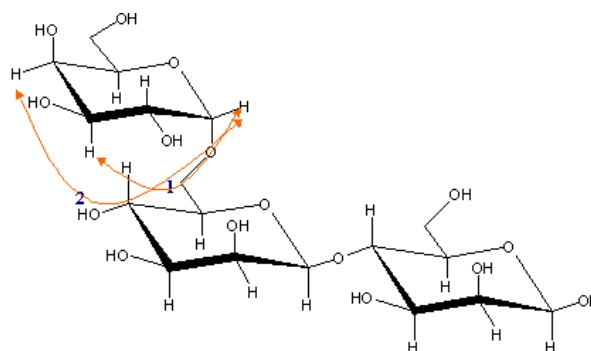


Figura 79: Espectro de TOCSY da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz), com pré-saturação do HOD.



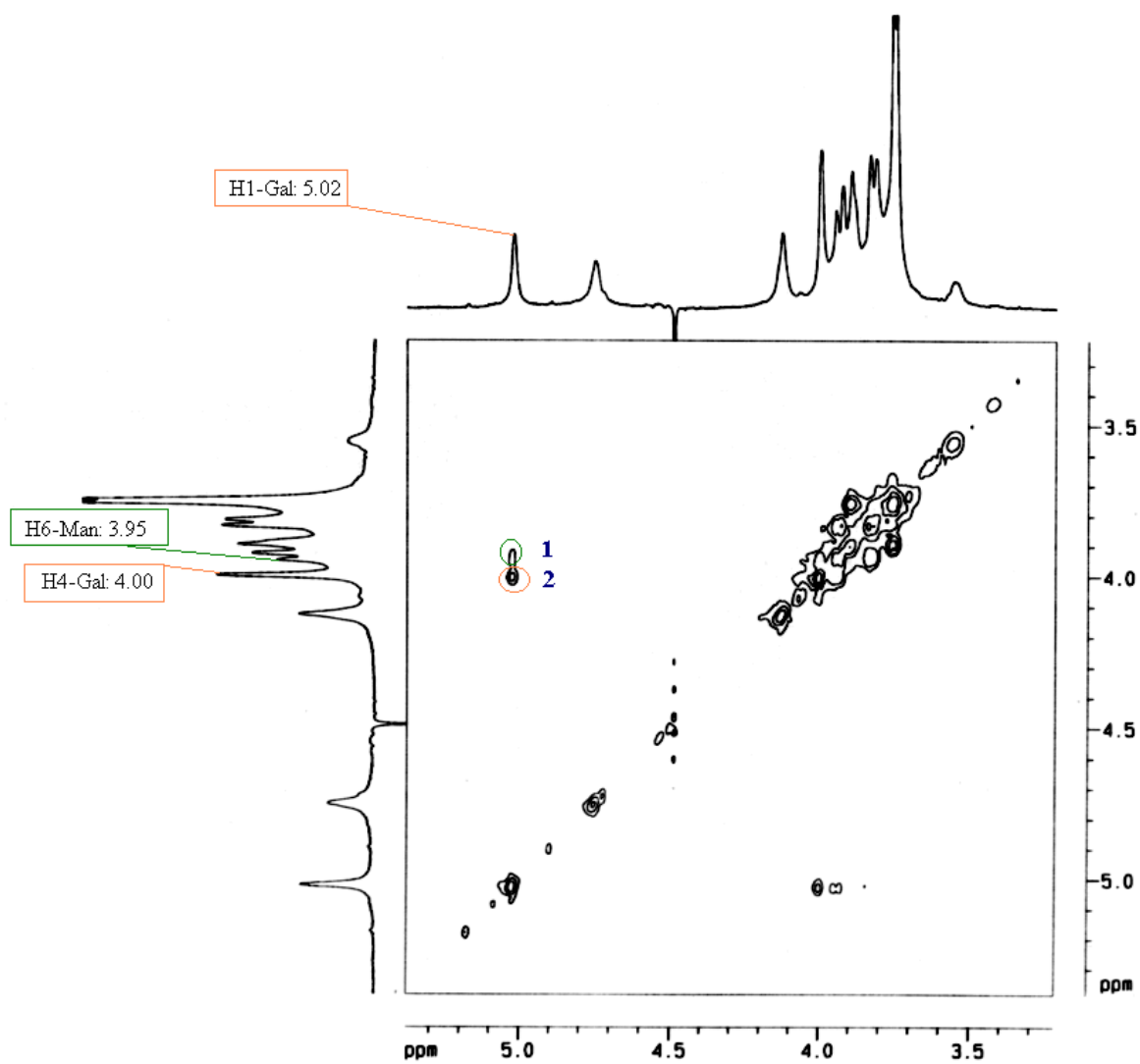
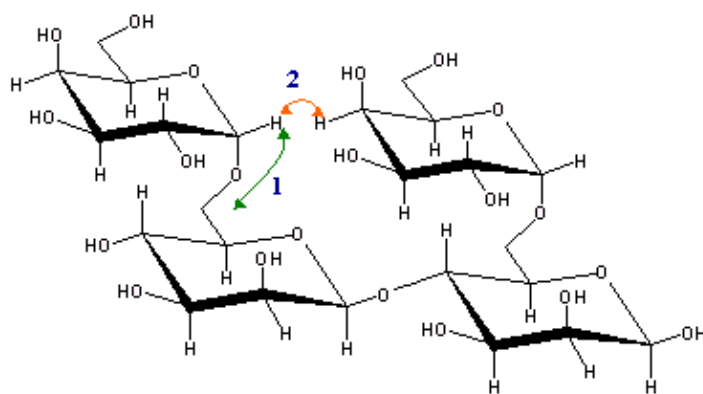


Figura 80: Espectro de ROESY da galactomanana nativa de sementes de *L. leucocephala* (LL), $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 500 MHz), com pré-saturação do HOD.



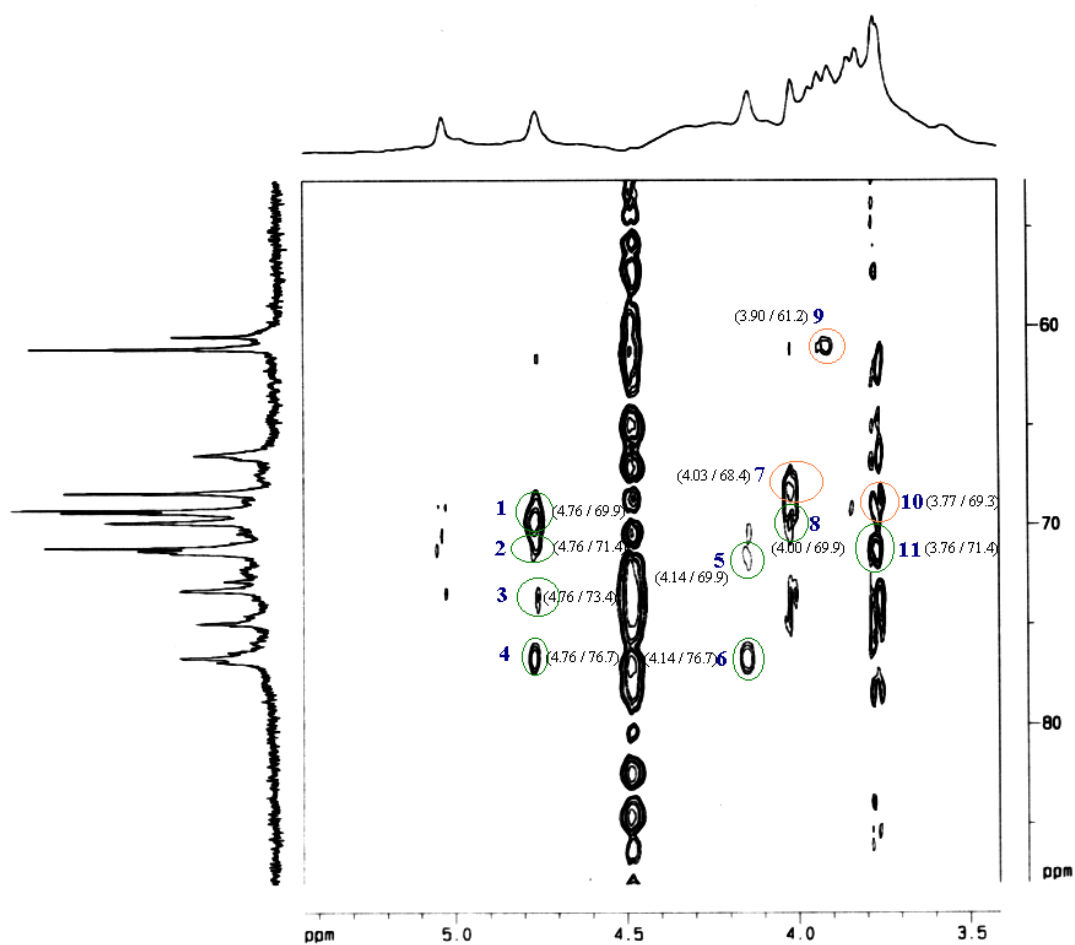
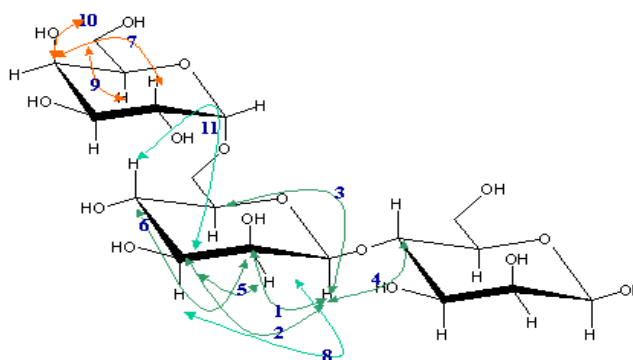


Figura 81: Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC da galactomanana de sementes de *L. leucocephala* modificada por sulfatação e despolimerizada (LLSD), $80 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em D_2O , a 50°C , (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), com pré-saturação do HOD.



C. Epidemiologia da dengue e da febre amarela:

A dengue e a febre amarela são arboviroses de importância no Brasil. Em 1982 foi registrada a primeira epidemia em Roraima com a identificação dos sorotipos DEN-1 e DEN-4. A partir de 1986 passaram a ser registradas epidemias de dengue em vários estados, a mais importante sendo a do Rio de Janeiro, nos anos de 1986/1987, estimando-se que, pelo menos 1 milhão de pessoas tenham sido infectadas pelo sorotipo DEN-1 (BRASIL, 2000^a). Entre 1986 e 1990, o sorotipo 1 disseminou-se para mais seis estados brasileiros, sendo identificado em 1990 o sorotipo DEN-2, no Rio de Janeiro. A partir de 1994, devido à grande dispersão do vetor *Aedes aegypti*, houve a disseminação dos sorotipos 1 e 2 para vinte dos vinte e sete estados do país. Entre 1990 e 2000, as regiões sudeste e nordeste do país foram responsáveis pelo maior número de notificações, com o sorotipo DEN-3 sendo identificado pela primeira vez no Rio de Janeiro em 2000. Em 2002 foram notificados 700.000 casos da doença, observando-se a circulação do sorotipo 3 em quase todo o país (BRASIL, 2003^a; BRASIL, 2003^b).

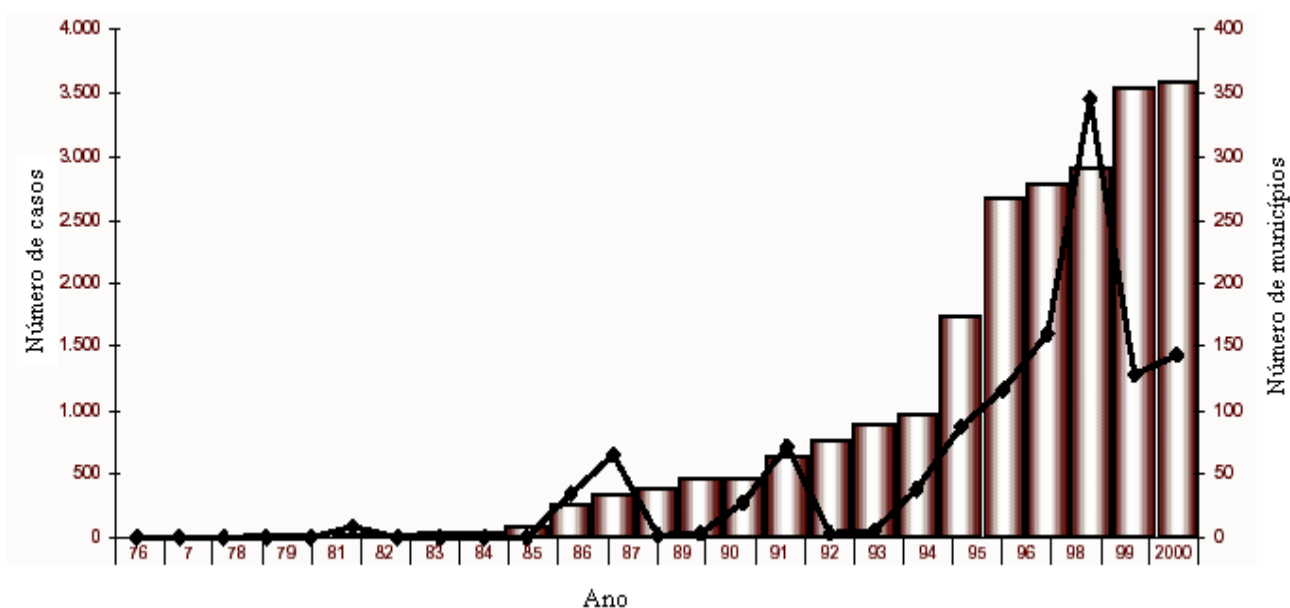


Figura 82: Incidência de dengue e número de municípios com o *Aedes aegypti*. Brasil, 1976-2000 (BRASIL, 2003^a).

Em 1990 foram registrados os primeiros casos de dengue hemorrágico no estado do Rio de Janeiro, logo após a circulação do sorotipo 2, com confirmação de 462 casos e 8 óbitos. Apesar da taxa de letalidade atípica registrada no ano de 1994 no Ceará, de 44%, entre 1990 e 1998, a taxa de letalidade média tem sido de 5%.

No panorama mundial, o vírus da dengue ocorre principalmente nas áreas tropicais da Ásia, Oceania, África e nas Américas. É relatado em mais de 100 países e cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas onde o dengue é endêmico. Cerca de 50-100 milhões de casos da doença são notificados mundialmente a cada ano e, desses, entre 250.000 – 500.000 casos são da forma hemorrágica. A taxa de letalidade varia de 0,5% a 3,5% nos países asiáticos (McBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000; GUZMÁN; KOURÍ, 2002).

Já a febre amarela tem apresentado de 2 a 66 casos por ano, na década de 90, nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil, e casos esporádicos em Minas Gerais (Figura 83, p. 156 e Tabela 25, p. 157), em virtude da ampla cobertura vacinal, porém apresentando letalidade alta, entre 50 e 100%, dependendo do ano (BRASIL, 2000^b). Entre 1980 e 1998 foram notificados 376 casos em todo o país, dos quais 216 evoluíram para o óbito. O maior surto epidêmico de febre amarela no país foi registrado no estado do Maranhão (1993-1994), notificando 87 casos da doença (BRASIL, 2003^b). A oscilação da taxa de letalidade para a febre amarela no Brasil (Figura 84, p. 158) pode estar relacionada ao sub-registro de casos menos graves que não chegaram a ser atendidos nas unidades de saúde ou não chegaram a ser confirmados/notificados como febre amarela (BRASIL, 2003^c). Embora o ciclo silvestre seja o único ativo no país, a presença do vetor urbano *Aedes aegypti* em muitos estados brasileiros coloca a possibilidade de reaparecimento da doença em sua forma urbana.

Apesar da existência de uma vacina contra a febre amarela (cepa 17D), a doença tem re-emergido com epidemia no continente africano, devido à baixa cobertura vacinal e ao não-controle dos vetores de transmissão. As epidemias na África têm afetado de dezenas a centenas de milhares de pessoas, com incidência de infecção de 20-30% e taxa de mortalidade superior a 20%. São iniciadas pela amplificação do ciclo silvestre (envolvendo macacos e mosquitos) e com eventual espalhamento para vilas e cidades infestadas pelo *Aedes aegypti* (ciclo urbano). Nas zonas de floresta pluvial e de vegetação de transição da África tropical e da América do Sul, a permanência da febre amarela se dá através de transmissão entre primatas não-humanos e mosquitos (principalmente *Ae. africanus* na África e *Haemagogus janthinomys* na América do Sul). O papel do ciclo de transmissão difere nos dois continentes: na América do Sul, os mosquitos são infectados com macacos virêmicos e a transmissão ao homem é pequena devido à baixa densidade populacional das áreas de floresta neotropical. Já as zonas de savana que circulam a zona de floresta pluvial da África apresentam alta densidade de vetores silvestres (*Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer*, *Ae. vittatus*) durante o período de chuvas. As zonas de savana, devido à atividade agrícola, apresentam alta densidade demográfica e a transmissão ao homem é alta (MONATH, 1994).

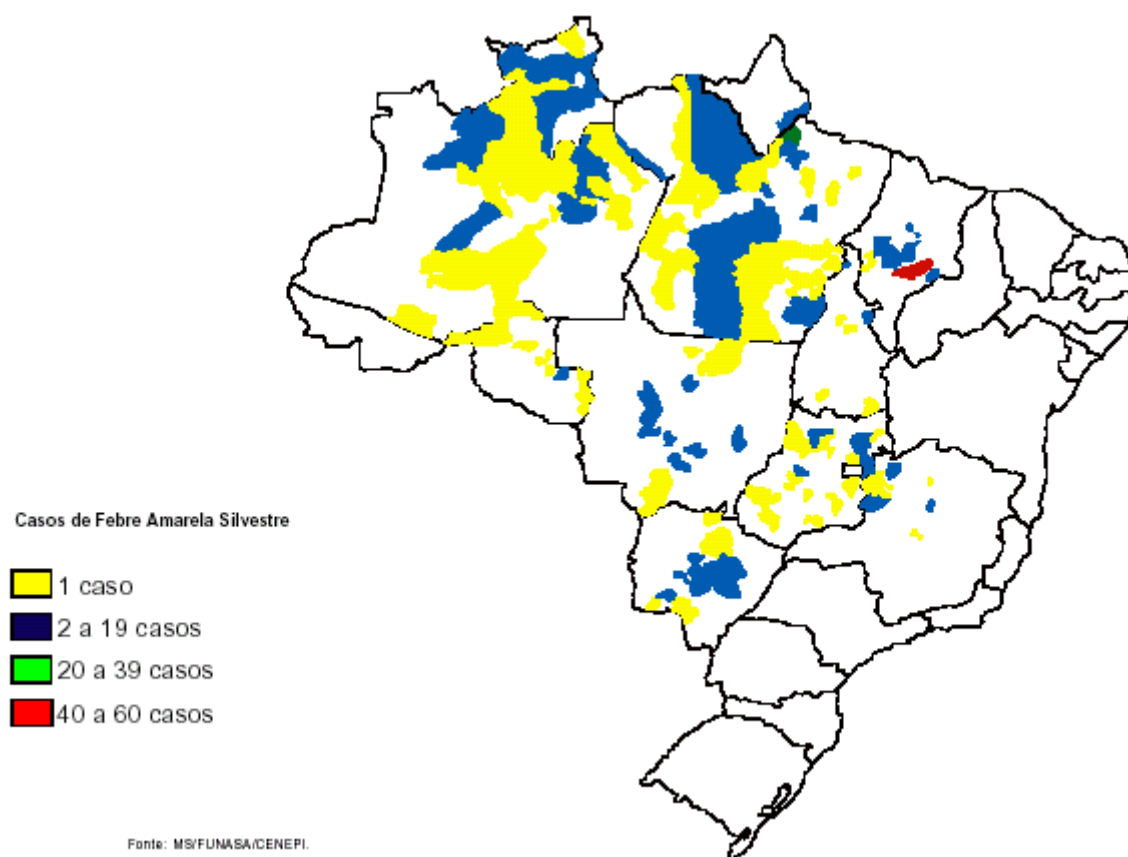


Figura 83: Distribuição dos municípios com febre amarela silvestre. Brasil, 1980-1998 (BRASIL, 2003^b).

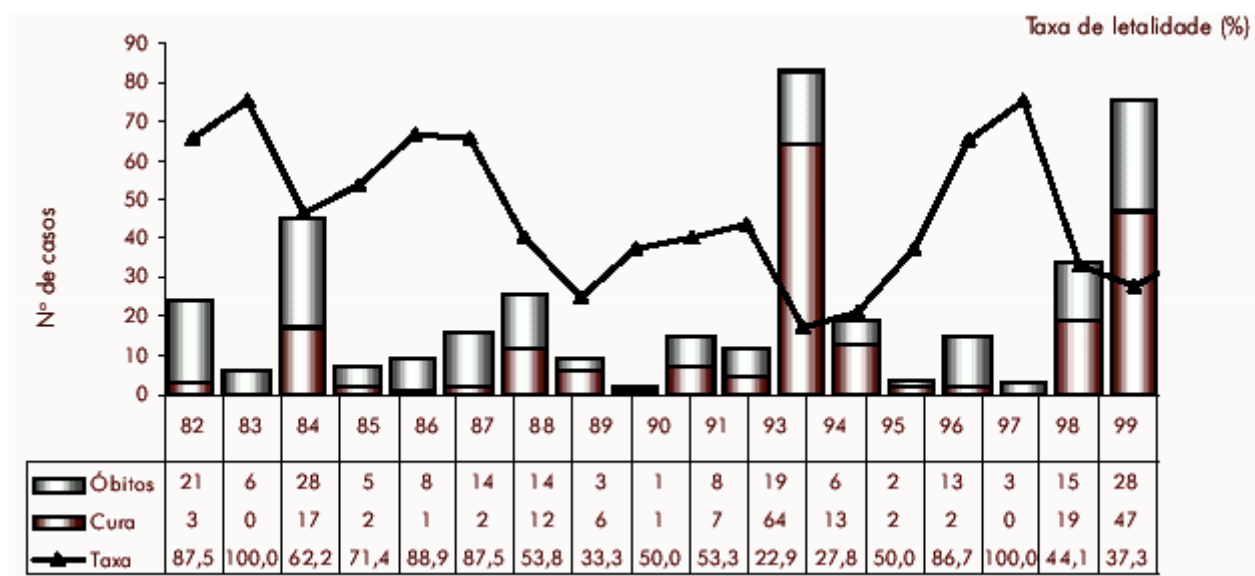


Figura 84: Febre amarela silvestre: óbitos, taxa de letalidade e cura. Brasil, 1982 a 2001 (BRASIL, 2003^c).

Tabela 25: Número de casos de dengue e de febre amarela obtidos por notificação compulsória no ano de 1999 e 2000, por Unidade Federada, Brasil (BRASIL, 2003^c).

UF/Região	Dengue ⁽²⁾			Febre Amarela ⁽¹⁾		
	1999	2000	Incid. 2000	1999	2000	Incid. 2000
Norte	15.429	31.069	250,56	60	9	0,07
Rondônia	979	3635	275,88	-	-	0,00
Acre	3	2.316	427,41	-	1	0,18
Amazonas	5.548	6.411	242,73	5	1	0,04
Roraima	3.978	7.295	2.670,60	3	-	0,00
Pará	2.613	8.218	136,86	36	1	0,02
Amapá	316	273	59,50	-	-	0,00
Tocantins	1.992	2.921	251,36	16	6	0,52
Nordeste	111.580	120.860	258,42	-	10	0,02
Maranhão	4.691	4.339	79,18	-	-	0,00
Piauí	2.252	7.336	266,44	-	-	0,00
Ceará	16.289	20.904	290,33	-	-	0,00
Rio Grande do Norte	19.567	17.121	637,72	-	-	0,00
Paraíba	13.509	22.804	671,17	-	-	0,00
Pernambuco	34.414	27.314	357,60	-	-	0,00
Alagoas	1.167	1.467	53,57	-	-	0,00
Sergipe	11.799	8.676	498,41	-	-	0,00
Bahia	7.892	10.899	82,98	-	10	0,08
Sudeste	66.715	65.112	92,02	-	4	0,01
Minas Gerais	16.312	26.361	150,70	-	2	0,01
Espírito Santo	634	19.034	638,57	-	-	0,00
Rio de Janeiro	9.083	4.281	30,72	-	-	0,00
São Paulo	40.686	15.436	42,46	-	2	0,01
Sul	1.455	4.760	19,24	-	-	0,00
Paraná	1.353	4.676	49,26	-	-	0,00
Santa Catarina	45	41	0,79	-	-	0,00
Rio Grande do Sul	57	43	0,43	-	-	0,00
Centro-Oeste	14.115	17.194	150,20	16	62	0,54
Mato Grosso do Sul	8.207	6.833	332,06	-	-	0,00
Mato Grosso	2.662	6.737	278,44	5	7	0,29
Goiás	2.550	2.594	52,37	11	53	1,07
Distrito Federal	696	1.030	51,08	-	2	0,10
Ignorado	-	-	-	-	-	-
Brasil	209.294	238.995	143,88	76	85	0,05

D. Prováveis fatores de implicação na manifestação da febre hemorrágica do dengue

Atualmente 3 teorias são mais divulgadas (McBRIDE; BIELEFELDT-OHMANN, 2000; BRASIL, 2003^a):

- 1) Aumento da infecção dependente de anticorpos: estudos epidemiológicos conduzidos na década de 60 e 70 na Tailândia sugeriam que a FHD se manifestava predominantemente em crianças que estavam vivendo uma segunda infecção com um sorotipo diferente do encontrado na primeira infecção. A resposta imunológica seria exacerbada, em função da produção de anticorpos não neutralizantes na primeira que aumentariam a infecção de macrófagos em uma segunda;
- 2) Fatores virais: a FHD também é observada em infecções primárias, sugerindo que fatores de virulência do vírus que os tornem capazes de infectar mais células, gerar maior progênie viral, causar inflamação mais severa e escapar dos mecanismos efetores do sistema imune, podem ter um papel essencial na patogênese da FHD;
- 3) Multicausalidade: alia outros fatores de risco às teorias de infecção sequencial e de virulência da cepa, como fatores individuais (raça, estado nutricional, presença de doenças crônicas como diabetes, asma brônquica e anemia falciforme) e epidemiológicos (alta densidade e eficiência dos vetores, ampla circulação do vírus).

O vírus da febre amarela, após um período de incubação de 3-6 dias, localiza-se nos gânglios linfáticos regionais, infecta o endotélio vascular e o fígado, manifestando sintomas inespecíficos como febre, cefaléia, mialgia, artralgia, dores ósseas generalizadas e vômitos numa primeira fase, de início súbito, conhecida com período de infecção, apresentando quadro clínico leve a moderado que dura em média 2 dias. A febre amarela apresenta um quadro bifásico: a primeira fase pode ser acompanhada de um período de remissão caracterizado por declínio da temperatura e diminuição dos sintomas que dura de poucas horas a 2 dias; a segunda fase é caracterizada por sintomas de insuficiência hepato-renal como icterícia, hematêmese, melena e outras manifestações hemorrágicas (epistaxe, otorragia e gengivorragia), oligúria, e anúria, albuminúria e prostração intensa. O pulso se torna mais lento apesar da temperatura elevada (sinal de Faget). O choque e as lesões hepática e renal graves podem resultar em óbito, sem terapia antiviral específica. A prevenção é feita pela administração da vacina atenuada 17D para indivíduos em risco de exposição (MIMS *et al.*, 1995; BRASIL, 2003^a).

E. Artigo publicado em periódico