

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTER MAZEPA

**ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE HETERORAMNANAS
SULFATADAS NATIVAS E MODIFICADAS QUIMICAMENTE OBTIDAS DA ALGA
VERDE *Gayralia brasiliensis***

CURITIBA

2017

ESTER MAZEPA

**ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE HETERORAMNANAS
SULFATADAS NATIVAS E MODIFICADAS QUIMICAMENTE OBTIDAS DA ALGA
VERDE *Gayralia brasiliensis***

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

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

Coorientadores: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Prof^a Dr^a Sheila M. B. Winnischofer

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Mazepa, Ester

Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas quimicamente obtidas da alga verde *Gayralia brasiliensis*. / Ester Mazepa. – Curitiba, 2017.
213 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Maria Eugênia Duarte Nosedá

Coorientador: Miguel Daniel Nosedá e Sheila M. B. Winnischofer

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Alga verde 2. Polissacarídeos 3. Estrutura química I. Título II. Nosedá, Maria Eugênia Duarte III. Nosedá, Miguel Daniel IV. Winnischofer, Sheila Maria Brochado V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.47



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor BL
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **ESTER MAZEPA**, intitulada: **"ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTITUMORAL DE HETERORAMNANAS SULFATADAS NATIVAS E MODIFICADAS QUIMICAMENTE OBTIDAS DA ALGA VERDE *Gayralia brasiliensis*"**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 06 de Dezembro de 2017.

MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CÉLIA REGINA CAVICHIOLO FRANCO
Avaliador Externo (UFPR)

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI
Avaliador Interno (UFPR)

MARIA ELIANE MERLIN ROCHA
Avaliador Interno (UFPR)

ELIANA BARRETO BERGTER
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais, Nilza e Antonio, aos meus tios, Sueli e Jair, e a todos aqueles que possam de alguma forma usufruir deste conteúdo.

AGRADECIMENTOS

Senhor Deus, te agradeço por estar sempre presente em minha vida, por guiar meus passos e decisões desde o início. Pela sua fidelidade e cuidado em todas as horas, por me fortalecer e dar a sabedoria necessária nos momentos em que eu achei que não era capaz de seguir em frente. Obrigada por ter a chance de explorar, estudar e compreender algo que um dia poderá ser usado para o benefício de alguém.

Mamãe e papai, lindos e amados! Eu amo muito vocês, e agradeço por serem meu porto seguro em todas as horas. Vocês são aqueles em quem posso confiar, meus ombros para chorar quando tudo dá errado e meus ombros para comemorar quando tudo é alegria! Obrigada por me aguentarem nos meus piores momentos, e também naqueles em que eu não paro de falar... Obrigada por sempre me sustentarem em oração, por permanecerem ao meu lado e torcendo por mim mesmo sem entender muito bem a pesquisa. Saibam que eu não teria chegado até aqui sem a educação e o ensino que vocês me deram desde sempre. Vocês também merecem este título! Agradeço também à tia e o tio, que da mesma forma estiveram sempre presentes, torcendo e me incentivando a continuar firme! Também amo vocês!

Agradeço à minha orientadora, professora Maria Eugênia, por ter me aceitado e confiado em meu trabalho. Por toda a orientação, pela paciência, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela amizade, e por estar sempre me estimulando a dar meu melhor. Cresci e aprendi muito com você nestes anos. Muito obrigada!

Ao professor Miguel, pelos ensinamentos e conselhos, por todas as sugestões e ideias para tornar este trabalho melhor, e pela amizade. Agradeço, Miguel e Eugênia, por poder fazer parte deste grupo de pesquisa do qual me orgulho muito. Hoje, após 8 anos desde que cheguei pela primeira vez neste laboratório, posso olhar para trás e dizer que evolui, tanto no conhecimento científico como na vida. Graças a vocês, que foram exemplos de dedicação, persistência, conhecimento e excelência de trabalho.

À professora Sheila, uma pessoa querida e maravilhosa, que aceitou me co-orientar na parte biológica deste trabalho, mesmo sendo um assunto totalmente novo e difícil para mim e do qual eu tinha muito medo. Seus ensinamentos, conversas, conselhos sobre a vida, e seu otimismo não me deixaram desanimar, e me fizeram ter certeza de que tudo que sonhamos é possível quando corremos atrás e nos dedicamos. Agora, com muito orgulho, também posso dizer que sou uma "Sheilets".

Um agradecimento especial à professora Célia Regina Cavichiolo Franco: obrigada por toda a ajuda e por todas as dicas com os experimentos de microscopia. Sua contribuição foi essencial para este trabalho. Sua energia contagiante, sua alegria e seu otimismo sempre me colocaram para cima. Obrigada!

A todo o pessoal que passou pelos laboratórios 248 e E3 durante meus 4 anos de doutorado: Amanda, Diego, Bárbara, Daniel, Jenifer, André, Rafael Castelli, Rafael Ramires, Mieko, Tati Winkler, Fran, Luciana, Mariana, Estela, Lucas, Tatiana Moro, Lauri, Michelle. Obrigada pela convivência, troca de ideias, dicas de trabalho, e pelas risadas.

Agradeço imensamente às amigas que os laboratórios 248 e o E3 me deram. Jeni: de início era quietinha e no seu canto, mas com o passar do tempo descobri uma pessoa querida, maravilhosa e de bom coração; realista, vê sempre todas as possibilidades de uma situação, é firme, pé no chão, e seus conselhos são sempre os mais acertados; obrigada pela sua amizade, pela parceria de sempre, pela torcida, por todos os “cafés da manhã” (pão de queijo com chocolate quente heheheh). Fran: minha irmã mais velha, do coração; sempre me salvando dos meus deslizes... Obrigada por me ensinar a crescer, tanto no lab como na vida; suas piadas sem graça são as melhores, e eu sempre dou risada; obrigada por me aturar praticamente todos os dias, pelos “Curitiba Light” de quase toda semana, pelos filmes com pipoca e sorvete no lab; pela parceria de sempre; sentirei muito sua falta. Amanda: tão quieta e concentrada no que está fazendo que às vezes esquece de responder o “oi” hehehe; sempre presente quando precisei de um ombro para chorar; obrigada pelas suas orações por mim sempre no momento certo, pelas várias conversas na cantina, sobre o trabalho e a vida. Tati Winkler: minha mãe científica, desde o início da IC me aguentando; me ensinou a gostar do que faço, aprendi muito com você; obrigada pela sua amizade e pela sua torcida sempre. Mieko: a mais animada de todas, todos sabiam quando você chegava, pois sempre estava cantando alto; trabalha muito, e de forma excelente; sua energia e alegria contagiantes por vezes me fizeram esquecer meus dias tristes; obrigada por sua amizade. Lu: a mulher dos metilados; manja muito Lu, obrigada por estar sempre disponível para me ajudar e ensinar as coisas difíceis do laboratório; pela amizade, pela parceria sempre, pelas risadas, pelos conselhos para o lab e para a vida. Mari: quietinha em seu canto, mas sabe de tudo que está acontecendo hehehe; uma pessoa boa e de grande coração; agradeço pela amizade que desenvolvemos neste período, por todas as suas ideias para melhorar a pesquisa, por todas as risadas e conselhos.

Às amigas que o laboratório E2 me deu. Shayla: sempre desesperada e com tantas coisas para fazer, mas sempre empenhada e dedicada para terminar; não é a toa que já tem artigos publicados hehehe; agradeço pela sua amizade, por todas as risadas, por todos os conselhos sobre tudo, por sempre me animar e pela torcida para que tudo desse certo. Sarinah: uma querida, tem um coração enorme e está sempre disposta a ajudar; não para um segundo, sempre no lab. aos finais de semana; obrigada pela amizade, pela ajuda com experimentos, pelas conversas de depois do expediente e risadas.

Às amigas que o laboratório de Oxidações 2 me deu. Rafa: sempre correndo com os experimentos, sempre no lab. aos finais de semana; me ajudou muito no início quando eu não entendia nada de cultivo celular (haja paciência hein hehehe), obrigada pela ajuda com tantos experimentos e pelas dicas no cultivo; agradeço pela

amizade que criamos desde então, pela torcida, pelos almoços, pelas cantinas e pelas conversas. Carol: sempre com o chimarrão; sua cara é a mais engraçada haha; obrigada por todas as dicas, e por me ajudar com os experimentos de western; obrigada pela amizade, pela torcida, pela convivência no lab, pelos almoços. Lis: a IC da Ju que eu sempre quis levar para o carboidratos hehehe; uma querida, sempre alegre, dedicada e trabalha muito; quem dera todos os IC's fossem como você! Ju Bark: é pouco tempo, mas parece que te conheço faz tempo; você é incrível, tem um coração enorme, inteligente e querida; parceira nas gordices e no cultivo; obrigada pela ajuda com os experimentos e pelas dicas com as células, pela amizade, pela torcida, pelos conselhos e pelas risadas; para sempre “nos almoços, nos divãs e no cultivo”.

Às amigas que a Célula 617 (da Bioquímica) me deu: Amanda, Cami, Ana Flávia, Liria, Adri, Iglesias, Liana. Incluir Deus em nossa rotina semanal fez toda a diferença, creio que na vida de todas nós e das pessoas ao nosso redor, enquanto estivemos aqui. Tanto no desenrolar dos nossos trabalhos, como na nossa forma de ser e de agir no laboratório. Agradeço pela torcida, pelas conversas e pela força que sempre me deram.

Aos meus colegas de outros laboratórios, os quais não citarei nomes pois são muitos e posso esquecer de alguém: E1, E2, 247, 250, 252, 259, oxidações, e demais laboratórios do andar de cima. Pela convivência agradável, empréstimos de material e dicas para a pesquisa.

Agradeço de forma especial à Juliana Cassolato, Juliana Ropellato e Mariana Mazetto. Suas pesquisas prévias que elucidaram a estrutura química fina das heteroramnanas sulfatadas da alga *Gayralia oxysperma* facilitaram muito o desenvolvimento desta tese.

À minha banca interna, professora Maria Eliane Merlin Rocha e professor Diogo Ricardo Bazan Ducatti, que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho desde o início. Obrigada pelas correções, sugestões e ensinamentos.

Ao Centro de RMN, pelas análises. Aos técnicos: Rosane, pelas análises de GC-MS; Mônica e Beth, pela manutenção dos materiais e reagentes do cultivo celular; Elis, pelas análises de HPSEC-MALLS-RID; Deonir, Gustavo e Rosângela, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura; Israel, pelas análises de microscopia confocal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, representado atualmente pela professora Glaucia Regina Martinez e professor Guilherme Lanzi Sassaki.

Às agências financiadoras, CAPES, CNPq e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

*Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água
no mar. Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota.*

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Polissacarídeos sulfatados sintetizados por algas marinhas apresentam grande variedade de atividades biológicas, como antiviral, anticoagulante e antitumoral. As diferentes características estruturais entre eles representam importantes ferramentas para o estudo das relações estrutura-atividade biológica. Modificações químicas que promovam o aumento do teor de grupos sulfato nestes polímeros melhoram significativamente seus efeitos biológicos. O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura química fina de heteroramnanas sulfatadas nativas e oversulfatadas obtidas da alga verde *Gayralia brasiliensis* e avaliar seus efeitos citotóxicos em células tumorais humanas de glioblastoma (linhagem U87MG) e melanoma (linhagem WM9). A alga seca e moída foi submetida a 4 extrações aquosas sequenciais (80°C, 4 h) originando as frações Gb1 a Gb4. Análises químicas e espectroscópicas demonstraram que estas frações são constituídas por heteroramnanas sulfatadas. A fração Gb1 (33% de rendimento, 29,3% de grupos sulfato) foi purificada por ultrafiltração em membrana (*cut-off* 300 kDa), originando uma fração homogênea em relação à massa molecular denominada Gb1r (33,4% de rendimento, M_w $1,371 \times 10^6$ g.mol⁻¹). Análises de metilação, dessulfatação e trideuteriometilação demonstraram que as frações Gb1 e Gb1r apresentam estrutura química constituída por cadeia principal contendo unidades de ramnose 3-ligada, 2-ligada e 2,3-dissubstituídas, em proporções de 1,00:0,52:0,08 e 1,00:0,39:0,37, respectivamente. Adicionalmente, as unidades 3- e 2-ligadas das frações Gb1 e Gb1r são monossulfatadas, dissulfatadas ou não substituídas por grupos sulfato, nas proporções de 1,0:0,53:0,31 e 1,0:0,48:0,23, respectivamente. Terminais não redutores de ácido β -D-glucurônico dissulfatados (em C-2 e C-4) e unidades de β -D-glucose 4-ligadas sulfatadas em C-6 foram pela primeira vez descritos para heteroramnanas sulfatadas. A fração Gb1 foi submetida à reação de sulfatação química, originando um produto oversulfatado com estrutura química inédita (Gb1-OS, 89% de rendimento, 55,4% de grupos sulfato). Análises de metilação conduzidas com a fração Gb1-OS carboxirreduzida demonstraram que houve inserção de grupos sulfato na maioria das unidades de α -L-ramnose 3- e 2-ligadas não sulfatadas e monossulfatadas. Adicionalmente, os terminais não redutores de α -L-ramnose e β -D-xilose foram trissulfatados, parte dos terminais não redutores de glucose e unidades de glucose 4-ligada foram totalmente sulfatados. As unidades de β -D-xilose 3-ligadas, assim como β -D-galactose 3,4-dissubstituída foram totalmente sulfatadas. Análises de RMN de ¹H, ¹³C, HSQC, COSY, TOCSY e NOESY das frações Gb1, Gb1r e Gb1-OS confirmaram os resultados de metilação. As frações Gb1 e Gb1-OS (100 μ g.mL⁻¹) exibiram atividade citotóxica em células tumorais humanas de glioblastoma (U87MG) e melanoma (WM9), através de indução de morte celular por apoptose. Corroborando esse resultado, a fração Gb1-OS (mais citotóxica) promoveu indução de fragmentação do DNA nas duas linhagens (54% em U87MG e 31% em WM9). Adicionalmente, em glioma a fração Gb1 provoca o aumento da porcentagem de células na fase G₁ do ciclo celular (13,6%), enquanto Gb1-OS provoca redução da porcentagem de células na fase G₁ (26,7%), aumento nas fases S (15,3%) e G₂ (11,4%). Em melanoma, não houve alteração no ciclo celular após tratamento com Gb1 e Gb1-OS. Vale ressaltar que Gb1-OS promoveu inibição da migração celular em células WM9. Nenhuma fração foi citotóxica para células normais de fibroblasto humano (linhagem MRC-5). O efeito citotóxico potencializado da fração Gb1-OS sobre as linhagens U87MG e WM9 foi correlacionado com o aumento da proporção de unidades de α -L-ramnose dissulfatadas em relação à heteroramnana nativa de *G. brasiliensis*.

Palavras-chave: Algas verdes. Polissacarídeos sulfatados. Oversulfatação. Estrutura química. Efeito citotóxico.

ABSTRACT

Sulfated polysaccharides biosynthesized by seaweeds present a wide range of biological activities, as antiviral, anticoagulant and antitumoral. The different chemical characteristics between them represent important tools for the study of structure-biological activity relationship. Chemical modifications that promote increasing of sulfate groups content in these polymers significantly improve their biological effects. The aim of this study was to determine fine chemical structure of native and oversulfated heterorhamnans obtained from the green seaweed *Gayralia brasiliensis* and evaluate their cytotoxic effect in human glioblastoma (U87MG) and melanoma (WM9) cell lines. Dried and milled seaweed was submitted to 4 sequential aqueous extractions (80°C, 4 h), giving rise to Gb1 to Gb4 fractions. Chemical and spectroscopic analyses showed that these fractions are constituted by sulfated heterorhamnans. Gb1 fraction (33% yield, 29.3% of sulfate groups) was purified by ultrafiltration (*cut-off* 300 kDa), giving rise to a homogeneous fraction in relation to molecular mass, named Gb1r (33.4% yield, Mw $1,371 \times 10^6$ g.mol⁻¹). Methylation, desulfation and trideuteromethylation analyses demonstrated that Gb1 and Gb1r present chemical structure constituted by a main chain containing 3-linked, 2-linked and 2,3-disubstituted rhamnosyl units at proportion of 1,00:0,52:0,08 and 1,00:0,39:0,37, respectively. Additionally, Gb1 and Gb1r 3- and 2-linked units are monosulfated, dissulfated or no-substituted by sulfate groups at proportions of 1,0:0,53:0,31 and 1,0:0,48:0,23, respectively. Dissulfated β -D-glucuronic acid non reducing terminals (at C-2 and C-4) and 4-linked β -D-glucosyl units sulfated at C-6 were described for the first time in sulfated heterorhamnans. Gb1 fraction was submitted to chemical sulfation reaction, giving rise to an oversulfated product with unpublished chemical structure (Gb1-OS, 89% yield, 55.4% of sulfate groups). Methylation analyses carried out with the carboxyl-reduced Gb1-OS demonstrated that sulfate groups were inserted in most part of no-sulfated and monosulfated 3- and 2-linked α -L-rhamnosyl units. Additionally, α -L-rhamnose and β -D-xylose non reducing terminals were trissulfated and part of β -D-glucose non reducing terminals and 4-linked β -D-glucose were totally sulfated. 3-linked β -D-xylosyl units, as well as 3,4-disubstituted β -D-galactosyl units were totally sulfated. ¹H, ¹³C, HSQC, COSY, TOCSY and NOESY NMR analyses of Gb1, Gb1r and Gb1-OS confirmed methylation results. Gb1 and Gb1-OS fractions (100 μ g.mL⁻¹) exhibited cytotoxic activity in human tumor cells of glioblastoma (U87MG) and melanoma (WM9), through apoptosis cell death induction in different proportions. Corroborating this result, Gb1-OS fraction (more cytotoxic) induced DNA fragmentation in both cell lines (54% in U87MG and 31% in WM9). Additionally, in glioma fraction Gb1 causes increasing in percentage of cells in cell cycle G₁ phase (13.6%), whereas Gb1-OS causes reduction in percentage of cells in G₂ phase (26.7%) and increasing of cells in S (15.3%) and G₂ phases (11.4%). In melanoma, no alterations in cell cycle were observed after treatment with Gb1 and Gb1-OS. It is noteworthy that Gb1-OS promoted cell migration inhibition in WM9 cells. None of the fractions were cytotoxic to normal human fibroblast cells (MRC-5 cell line). The potentiated effect of Gb1-OS fraction on U87MG and WM9 cell lines was correlated with increasing proportions of dissulfated α -L-rhamnosyl units when compared to native heterorhamnans from *G. brasiliensis*.

Key-words: Green seaweeds. Sulfated polysaccharides. Oversulfation. Chemical structure. Cytotoxic Effect.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ASPECTO GERAL DA ALGA VERDE <i>Gayralia brasiliensis</i>	31
FIGURA 2	DISSACARÍDEOS REPETITIVOS PRESENTES NAS ULVANAS.....	33
FIGURA 3	ESQUEMA HIPOTÉTICO DE PERSULFATAÇÃO DE UMA HETERORAMNANA	40
FIGURA 4	PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL.....	53
FIGURA 5	CICLO CELULAR.....	56
FIGURA 6	VIAS EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA APOPTOSE.....	59
FIGURA 7	CÉLULAS DA GLIA.....	62
FIGURA 8	CAMADAS DA PELE	66
FIGURA 9	FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G.</i> <i>brasiliensis</i>	72
FIGURA 10	FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G.</i> <i>brasiliensis</i>	93
FIGURA 11	ESPECTRO DE ^{13}C DAS HETERORAMNANAS SULFATADAS Gb1 - Gb4 DE <i>G. brasiliensis</i>	97
FIGURA 12	CROMATOGRAMAS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RID DAS FRAÇÕES BRUTAS Gb1 (A), Gb2 (B), Gb3 (C) E Gb4 (D).....	98
FIGURA 13	FLUXOGRAMA DE ULTRAFILTRAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA Gb1...	99
FIGURA 14	CROMATOGRAMAS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RI DAS FRAÇÕES Gb1r (A) E Gb1e (B)	99
FIGURA 15	CROMATOGRAMAS DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r e Gb1e	100
FIGURA 16	REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE ^1H DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1r.....	103
FIGURA 17	ESPECTROS DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1r.	104
FIGURA 18	SEQUÊNCIA METODOLÓGICA PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL FINA DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1r.....	105
FIGURA 19	EXEMPLO DE CARBOXIRREDUÇÃO NA PRESENÇA DE NaBH_4 (A) E NaBD_4 (B). FRAGMENTOS DE MASSA REFERENTES À HEXOSE NEUTRA (217) E HEXOSE ORIGINADA DE ÁCIDO URÔNICO (C).106	

FIGURA 20	ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD ..	122
FIGURA 21	REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD.....	123
FIGURA 22	REGIÃO DOS CARBONOS DO ANEL DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD	124
FIGURA 23	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C -DEPT DA FRAÇÃO Gb1-RD.....	125
FIGURA 24	ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD ...	126
FIGURA 25	REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD.....	127
FIGURA 26	ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Gb1.....	130
FIGURA 27	ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Gb1r	131
FIGURA 28	ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Gb1-RD	134
FIGURA 29	ESPECTRO DE RMN DE NOESY DA FRAÇÃO Gb1-RD	136
FIGURA 30	SUGESTÕES DE SEQUÊNCIA DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS PRESENTES NAS HETERORAMNANAS SULFATADAS DE <i>G. brasiliensis</i>	137
FIGURA 31	ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DAS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NAS HETERORAMNANAS SULFATADAS NATIVAS DE <i>G. brasiliensis</i>	138
FIGURA 32	CROMATOGRAMA DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO Gb1-OS	142
FIGURA 33	CROMATOGRAMA DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RI COMPARATIVO ENTRE Gb1 E Gb1-OS	143
FIGURA 34	ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS	149
FIGURA 35	REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS	150
FIGURA 36	REGIÃO DOS CARBONOS DO ANEL DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS	151
FIGURA 37	ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS	154
FIGURA 38	ESPECTROS DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Gb1-OS.....	155
FIGURA 39	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL	158

FIGURA 40	CÉLULAS DA LINHAGEM U87MG	159
FIGURA 41	EFEITO CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS NA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO (U87MG) APÓS TRATAMENTO POR 72 HORAS	160
FIGURA 42	HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS U87MG SEM TRATAMENTO.....	162
FIGURA 43	PORCENTAGEM DE CÉLULAS U87MG NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS.....	163
FIGURA 44	PORCENTAGEM DE DNA FRAGMENTADO EM CÉLULAS U87MG APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS	164
FIGURA 45	PORCENTAGEM DE CÉLULAS U87MG MARCADAS OU NÃO COM ANEXINA E/OU IODETO DE PROPÍDEO APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS.....	165
FIGURA 46	ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO (U87MG) EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS.....	169
FIGURA 47	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO (U87MG) EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS.....	171
FIGURA 48	CÉLULAS DA LINHAGEM WM9	172
FIGURA 49	EFEITO CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS NA LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO (WM9) APÓS TRATAMENTO POR 72 HORAS	173
FIGURA 50	PORCENTAGEM DE CÉLULAS WM9 NA DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS.....	175
FIGURA 51	PORCENTAGEM DE DNA FRAGMENTADO EM CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS	176

FIGURA 52	PORCENTAGEM DE CÉLULAS WM9 MARCADAS OU NÃO COM ANEXINA E/OU IODETO DE PROPÍDEO APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS.....	178
FIGURA 53	<i>WESTERN BLOTTING</i> PARA DETECÇÃO DE CASPASE 3 FOSFORILADA NA LINHAGEM WM9 APÓS TRATAMENTO COM Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS	179
FIGURA 54	ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO (WM9) EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS	182
FIGURA 55	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO (WM9) EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS.....	184
FIGURA 56	NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS.....	185
FIGURA 57	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE <i>Scratch in vitro</i> APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 0, 24 E 48 HORAS	186
FIGURA 58	EFEITO CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS NA LINHAGEM NORMAL DE FIBROBLASTO HUMANO (MRC-5) APÓS TRATAMENTO POR 72 HORAS	191

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES DA ORDEM ULOTRICHALES	37
TABELA 2	– ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS VERDES DA ORDEM ULOTRICHALES	42
TABELA 3	– ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS OVERSULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS	48
TABELA 4	– DILUIÇÕES E MARCAÇÕES PARA O ENSAIO DE MORTE CELULAR	86
TABELA 5	– RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. brasiliensis</i>	94
TABELA 6	– MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. brasiliensis</i>	95
TABELA 7	– RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Gb1r e Gb1e	101
TABELA 8	– MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. brasiliensis</i>	102
TABELA 9	– RENDIMENTOS, TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1r ANTES E APÓS CARBOXIRREDUÇÃO	108
TABELA 10	– RENDIMENTOS, TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Gb1-R E Gb1r-R ANTES E APÓS DESSULFATAÇÃO	109
TABELA 11	– ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES Gb1-R, Gb1-RD, Gb1r-R e Gb1r-RD.....	111
TABELA 12	– ANÁLISE DOS DERIVADOS DE RAMNOSE OBTIDOS APÓS TRIDEUTERIOMETILAÇÃO DAS FRAÇÕES Gb1-R E Gb1r-R....	117
TABELA 13	– COMPARAÇÃO ENTRE OS PADRÕES DE SUBSTITUIÇÃO PRESENTES NAS HETERORAMNANAS SULFATADAS DE <i>G. brasiliensis</i> E <i>G. oxysperma</i>	120

TABELA 14 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS UNI E BIDIMENSIONAIS DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r e Gb1-RD.....	135
TABELA 15 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DO ESPECTRO BIDIMENSIONAL ^1H , ^1H -NOESY DA FRAÇÃO Gb1-RD E SEQUÊNCIA DE LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS PROPOSTAS....	138
TABELA 16 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO Gb1-OS	141
TABELA 17 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NA FRAÇÃO Gb1-OS.....	142
TABELA 18 – RENDIMENTOS, TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS APÓS CARBOXIRREDUÇÃO	144
TABELA 19 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO Gb1-OS-R.....	147
TABELA 20 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS UNI E BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO Gb1-OS	156
TABELA 21 – COMPARAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS SOBRE CÉLULAS U87MG E WM9	190

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, TERMOS E ABREVIATURAS

DEPT	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra acético
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CMC	- 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida
COSY	- <i>Correlation Spectroscopy</i>
HSQC	- <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy</i>
HPSEC-MALLS-RI	- Cromatografia de exclusão estérica de alta performance acoplada a detector de índice de refração e espalhamento de luz
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
RI	- Índice de refração
IS	- Índice de seletividade
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NOESY	- <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ROS	- Espécies reativas do oxigênio
TOCSY	- <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Gb1-Gb4	- Frações brutas obtidas por extrações aquosas a 80°C
Gb1-R	- Fração bruta carboxirreduzida
Gb1-RD	- Fração bruta carboxirreduzida e dessulfatada
Gb1r	- Fração retida por ultrafiltração em membrana de 300 kDa
Gb1e	- Fração eluída por ultrafiltração em membrana de 300 kDa
Gb1r-R	- Fração Gb1r carboxirreduzida
Gb1r-RD	- Fração Gb1r carboxirreduzida e dessulfatada
Gb1-OS	- Fração Gb1 oversulfatada
Gb1-OS-R	- Fração Gb1 oversulfatada e carboxirreduzida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	JUSTIFICATIVA	25
1.2	OBJETIVOS	26
1.2.1	Objetivo Geral.....	26
1.2.2	Objetivos Específicos	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	ALGAS MARINHAS.....	27
2.2	ALGAS VERDES (CHLOROPHYTA)	29
2.2.1	Características gerais das algas verdes (Chlorophyta)	29
2.2.1.1	Características gerais das algas verdes do gênero <i>Gayralia</i>	30
2.2.2	Polissacarídeos sulfatados de algas verdes.....	31
2.3	MÉTODOS DE SULFATAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS.....	39
2.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS VERDES.....	41
2.5	PROLIFERAÇÃO CELULAR E DESENVOLVIMENTO DE TUMORES ...	51
2.5.1	Vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento tumoral	51
2.5.2	Ciclo Celular	53
2.5.3	Morte celular.....	56
2.5.3.1	Apoptose	56
2.5.3.2	Necrose	59
2.5.3.3	Autofagia	60
2.6	TUMORES CEREBRAIS - GLIOMAS	61
2.7	TUMORES DE PELE - MELANOMA.....	65
2.8	ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS VERDES.....	68
3	MATERIAL E MÉTODOS	71
3.1	POSICIONAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Gayralia brasiliensis</i>	71
3.2	COLETA E PROCESSAMENTO DA MACROALGA <i>Gayralia brasiliensis</i>	71
3.3	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>G. brasiliensis</i>	71
3.4	PURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA	72
3.5	PERSULFATAÇÃO QUÍMICA DA HETERORAMNANA SULFATADA Gb1	73

3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	73
3.6.1	Dosagem de carboidratos totais	73
3.6.2	Dosagem de proteínas totais.....	74
3.6.3	Teor de grupos sulfato.....	74
3.6.4	Teor de ácidos urônicos	74
3.6.5	Determinação da rotação óptica.....	75
3.7	MÉTODOS QUÍMICOS DE ANÁLISE	75
3.7.1	Hidrólise ácida total, redução e acetilação	75
3.7.2	Carboxirredução	75
3.7.3	Dessulfatação por tratamento solvolítico	76
3.7.3.1	Preparo do sal de piridônio.....	76
3.7.3.2	Solvólise	77
3.7.4	Metilação	77
3.7.4.1	Preparo do sal de trietilamônio	77
3.7.4.2	Metilação e derivatização	77
3.7.4.3	Trideuteriometilação	78
3.8	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, ESPECTROMÉTRICOS E ESPECTROSCÓPICOS.....	78
3.8.1	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)..	78
3.8.2	Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance (HPSEC) Acoplada a Espalhamento de Luz Laser Multiângulos (MALLS) e Detector de Índice de Refração (RID)	79
3.8.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	80
3.9	ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL.....	80
3.9.1	Linhagens celulares utilizadas.....	81
3.9.2	Esterilização dos materiais	81
3.9.3	Soluções e meios de cultivo	82
3.9.3.1	Solução de tripsina-EDTA	82
3.9.3.2	Solução salina-fosfato tamponada (PBS).....	82
3.9.3.3	Meio DMEM.....	82
3.9.3.4	Meio TU	83
3.9.4	Manutenção e preservação das células em cultura.....	83
3.9.5	Preparo das frações polissacarídicas para os ensaios biológicos.....	84

3.9.6	Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	84
3.9.7	Ensaio de viabilidade celular por vermelho neutro	85
3.9.8	Ensaio de ciclo celular.....	85
3.9.9	Ensaio de morte celular por anexina e iodeto de propídeo	86
3.9.10	Western blotting.....	87
3.9.10.1	Lise celular para extração de proteínas.....	87
3.9.10.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	88
3.9.10.3	Deteção de caspase 3	88
3.9.11	Ensaio de migração celular por <i>Scratch in vitro</i>	89
3.9.12	Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio (ROS)	89
3.9.13	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	90
3.9.14	Análise de Imunofluorescência.....	91
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.1	OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. brasiliensis</i>	92
4.1.1	Extração das frações brutas de <i>G. brasiliensis</i>	92
4.1.2	Análises químicas das frações brutas de <i>G. brasiliensis</i>	93
4.1.3	Composição monossacarídica das frações brutas de <i>G. brasiliensis</i>	94
4.1.4	Análises de RMN de ¹³ C das frações brutas de <i>G. brasiliensis</i>	95
4.1.5	Análise de homogeneidade das frações brutas de <i>G. brasiliensis</i>	98
4.2	PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA Gb1	99
4.2.1	Ultrafiltração em membrana	99
4.2.2	Análises químicas da fração homogênea Gb1r.....	101
4.2.3	Composição monossacarídica em termos de monossacarídeos neutros das frações Gb1r e Gb1e	101
4.2.4	Análises de RMN de ¹ H e ¹³ C da fração Gb1r.....	102
4.3	ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1r.....	105
4.3.1	Carboxirredução das frações Gb1 e Gb1r.....	106
4.3.2	Dessulfatação solvolítica das frações Gb1-R e Gb1r-R	108
4.3.3	Análise de metilação das frações Gb1-R, Gb1-RD, Gb1r-R e Gb1r-RD	109
4.3.3.1	Análise de metilação das frações Gb1-R e Gb1-RD	112
4.3.3.2	Análise de metilação das frações Gb1r-R e Gb1r-RD	114
4.3.4	Análises de trideuteriometilação das frações Gb1-R e Gb1r-R	115

4.3.5	Análise comparativa dos resultados de metilação das frações nativa e homogênea (Gb1 e Gb1r)	119
4.3.6	Análises de RMN das frações Gb1, Gb1-RD e Gb1r.....	120
4.4	SULFATAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO Gb1.....	140
4.4.1	Análises químicas da fração Gb1-OS.....	141
4.4.2	Composição monossacarídica da fração Gb1-OS.....	141
4.4.3	Análise de homogeneidade da fração Gb1-OS	142
4.5	ANÁLISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO Gb1-OS.....	143
4.5.1	Carboxirredução da fração Gb1-OS	144
4.5.2	Análise de metilação da fração Gb1-OS	145
4.5.3	Análises de RMN da fração Gb1-OS.....	148
4.6	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL	157
4.6.1	Efeito citotóxico dos polissacarídeos em modelo de glioblastoma humano (U87MG).....	158
4.6.1.1	Efeito citotóxico dos polissacarídeos em células U87MG	159
4.6.1.2	Análise do ciclo celular	161
4.6.1.3	Análise do mecanismo de morte celular por anexina e iodeto de propídeo	164
4.6.1.4	Análise morfológica e ultraestrutural de células U87MG por microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.).....	167
4.6.1.5	Análise morfológica de células de glioblastoma humano (U87MG) por microscopia confocal de imunofluorescência	170
4.6.2	Efeito citotóxico dos polissacarídeos em modelo de melanoma humano (WM9).....	172
4.6.2.1	Efeito citotóxico dos polissacarídeos em células WM9	172
4.6.2.2	Análise do ciclo celular	175
4.6.2.3	Análise da morte celular por anexina e iodeto de propídeo.....	176
4.6.2.4	Expressão de caspase 3 envolvida no processo apoptótico	179
4.6.2.5	Análise morfológica e ultraestrutural de células de melanoma humano por microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.)	180
4.6.2.6	Análise morfológica de células de melanoma humano (WM9) por microscopia confocal de imunofluorescência	183
4.6.2.7	Determinação dos níveis de espécies reativas do oxigênio	185
4.6.2.8	Avaliação da migração celular.....	185

4.6.3	Comparação dos efeitos citotóxicos de Gb1 e Gb1-OS em células tumorais humanas de glioblastoma (linhagem U87MG) e melanoma metastático (linhagem WM9).....	188
4.6.4	Efeito citotóxico das heteroramnanas nativas e quimicamente modificadas em células normais de fibroblasto humano (MRC-5).....	191
5	RESUMO DOS RESULTADOS	192
6	CONCLUSÕES	195
	REFERÊNCIAS.....	199

1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas apresentam uma grande variedade de atividades biológicas como antiviral (DUARTE *et al.*, 2001; DUARTE *et al.*, 2004; CASSOLATO *et al.*, 2008), anticoagulante (ARAÚJO *et al.*, 2013), imunomodulatória (LEIRO *et al.*, 2007; TABARSA *et al.*, 2012), antioxidante (QI *et al.*, 2005), antitumoral (ROPELLATO *et al.*, 2015), antiangiogênica (DIAS *et al.*, 2005; YAO *et al.*, 2014) e antihiperlipidêmica (PENGZHAN *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2012). Estas propriedades biológicas estão associadas à presença de diferentes monossacarídeos, graus de sulfatação e posicionamento de grupos sulfato, e massa molecular.

O litoral do Brasil apresenta uma grande biodiversidade de macroalgas que produzem polissacarídeos sulfatados com estruturas químicas únicas. Entretanto, estas moléculas são pouco exploradas quanto às suas características químicas e potencial biológico. Desta forma, o estudo da estrutura química e das atividades biológicas dos biopolímeros produzidos por algas presentes no litoral brasileiro, aliado à possibilidade de cultivo destes organismos em fazendas marinhas, é um campo a ser explorado e representa um potencial interesse econômico para o país.

As algas verdes do gênero *Gayralia* sp. (Ulotrichales), tais como *G. oxysperma*, produzem polissacarídeos denominados heteroramnanas sulfatadas com potenciais atividades biológicas. Outra espécie do gênero *Gayralia*, *G. brasiliensis*, representa uma importante biomassa a ser explorada, disponível no litoral brasileiro e é passível de cultivo em fazendas marinhas.

Em nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Glicobiologia Estrutural de Carboidratos de Algas Marinhas, GLICAM), a estrutura química fina de uma heteroramnana sulfatada ($1,519 \times 10^6$ g.mol⁻¹) obtida de *Gayralia oxysperma*, e sua potencial atividade antiviral contra os vírus da herpes simplex (HSV-1 e HSV-2) foram descritas. Este polímero apresenta diferentes proporções de unidades de ramnose 3-ligadas, as quais são sulfatadas em C-2 e/ou C-4 com menores proporções de unidades não sulfatadas, e 2-ligadas majoritariamente sulfatadas em C-3, C-4 ou ambos com menores proporções de unidades não sulfatadas. Além disto, apresenta unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas como pontos de ramificação para ácidos urônicos e xilose, os quais podem estar sulfatados ou não em C-4 (CASSOLATO *et al.*, 2008). Frações de menor massa molecular deste

polissacarídeo, obtidas após degradação controlada de Smith, são constituídas por unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 ou C-4 e 2-ligadas sulfatadas em C-4 ou ambos C-3 e C-4, em diferentes proporções. A presença de unidades dissulfatadas pode contribuir para um efeito citotóxico mais pronunciado destes polissacarídeos contra células tumorais de glioblastoma humano (linhagem U87MG) (ROPELLATO *et al.*, 2015).

Diferentes características estruturais entre polissacarídeos nativos e modificados quimicamente representam importantes ferramentas para o estudo das relações estrutura-atividade biológica. Adicionalmente à degradação controlada de Smith, modificações químicas como a oversulfatação aumentam o teor de grupos sulfato em polissacarídeos, melhorando significativamente seus efeitos biológicos (YAMADA *et al.*, 1997; KOYANAGI *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2014).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, utilizando carragenanas obtidas de diferentes espécies de algas vermelhas (*Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottsbergii*) demonstraram a influência da regioquímica de grupos sulfato na atividade anticoagulante (ARAÚJO *et al.*, 2013). Diferentes tipos de carragenanas (*-kappa*, *-iota* e *-theta*) foram seletivamente sulfatadas ou oversulfatadas, gerando polímeros com padrão de sulfatação inédito, os quais potencializaram o efeito anticoagulante quando comparadas com suas frações de origem. As κ -carragenanas oversulfatadas e as carragenanas sulfatadas em C-2 (unidades de 3,6-anidro- α -D-Galp) e C-6 (unidades de β -D-Galp) apresentaram os melhores efeitos anticoagulantes, demonstrando que não somente o teor de grupos sulfato, mas também o posicionamento destes grupos tem influência na potencialização da atividade biológica (ARAÚJO *et al.*, 2013).

Entretanto, até onde se sabe, não existem relatos demonstrando o efeito citotóxico de heteroramnanas quimicamente sulfatadas de algas verdes em linhagens tumorais humanas. Desta forma, este trabalho buscou estudar a correlação estrutura química-atividade biológica de polissacarídeos sulfatados nativos e modificados quimicamente obtidos da alga verde *Gayralia brasiliensis* (Ulotrichales) através do estudo da estrutura química fina e do efeito biológico em células tumorais humanas de glioblastoma (U87MG) e melanoma (WM9).

1.1 JUSTIFICATIVA

Devido à grande diversidade estrutural dos polissacarídeos produzidos por macroalgas marinhas, seja pela composição monossacarídica, grau de sulfatação, posição destes grupos, tipos de ligações glicosídicas, enantiomericidade e massa molecular, estes polímeros desempenham diferentes atividades biológicas de interesse na área biomédica, tais como antiviral, antioxidante, anticoagulante, imunoestimulante, antiangiogênica e antitumoral (DUARTE *et al.*, 2001; DUARTE *et al.*, 2004; DIAS *et al.*, 2005; QI *et al.*, 2005; LEIRO *et al.*, 2007; CASSOLATO *et al.*, 2008; TABARSA *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2014; ROPELLATO *et al.*, 2015). A maioria dos efeitos biológicos apresentados por estes polímeros está relacionada à massa molecular, teor, e principalmente posicionamento de grupos sulfato ao longo da cadeia polissacarídica.

Dentre as algas verdes, aquelas que pertencem à ordem Ulotrichales, notavelmente os gêneros *Monostroma* sp. e *Gayralia* sp., produzem polissacarídeos constituídos majoritariamente por unidades de α -L-ramnose, contendo alto teor de grupos sulfato. O gênero *Monostroma* é utilizado na alimentação humana principalmente em países orientais, e tem sido alvo de patentes internacionais como parte da composição de cosméticos para nutrição da pele (MAJMUDAR, 2006), ramnanas sulfatadas com ação antiúlcera (NAGAOKA *et al.*, 1997), anti-trombótica (DANIELS, 2007), anti-diabética (DANIELS, 2007) e anti-inflamatória (DANIELS, 2005). O gênero *Gayralia* foi recentemente descrito no litoral brasileiro, e é alvo de estudo em nosso grupo de pesquisa, tanto no âmbito de estrutura química fina quanto de atividades biológicas. Os polissacarídeos sulfatados nativos e quimicamente modificados obtidos das espécies *G. oxysperma* e *G. brasiliensis* apresentam propriedade formadora de gel, e atividades antiviral, anti-angiogênica, anticoagulante e antitumoral (CASSOLATO *et al.*, 2008; BERTÉ, 2013; NASATTO *et al.*, 2013; ROPELLATO *et al.*, 2015).

Muitos dos fármacos antitumorais utilizados na clínica atual contra diferentes tipos de tumores têm eficácia limitada. Pacientes portadores de tumores mais agressivos, tais como o glioblastoma e o melanoma metastático, apresentam prognóstico ruim e taxa de sobrevida muito baixa, mesmo quando submetidos ao tratamento com os fármacos de escolha temozolomida e dacarbazina,

respectivamente. O prognóstico ruim ocorre principalmente porque as células tumorais desenvolvem mecanismos de resistência ao tratamento com quimioterápicos (ROCHA *et al.*, 2016). Neste sentido, torna-se necessário o estudo e desenvolvimento de novas terapias. Diversos trabalhos evidenciam o potencial antitumoral dos polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas marinhas, que em sua maioria são citotóxicos para células tumorais e não são tóxicos para células normais (KOYANAGI *et al.*, 2003; TERUYA *et al.*, 2007; JIAO *et al.*, 2009; KARNJANAPRATUM; YOU, 2011; YUAN *et al.*, 2011; ROPELLATO *et al.*, 2015). Sendo assim, estes polímeros representam agentes promissores nesta área de estudo.

O estudo da estrutura química fina de polissacarídeos sulfatados que apresentam atividade biológica é essencial, pois permite um melhor entendimento dos mecanismos de ação envolvidos e provê informações necessárias para estabelecer correlações entre estrutura e atividade. Adicionalmente, estudos tem demonstrado que modificações químicas tais como a sulfatação química, podem potencializar os efeitos já descritos para estes polímeros em diferentes modelos biológicos. Entretanto, poucos são os trabalhos que aprofundam o estudo estrutural dos polímeros modificados. Desta forma, a elucidação estrutural dos polissacarídeos nativos e modificados é indispensável, tanto para o entendimento dos mecanismos de ação biológica, como para o estabelecimento de correlações estrutura-atividade.

Vale ressaltar que até o presente momento não foram publicados trabalhos abordando oversulfatação de polissacarídeos de algas verdes da ordem Ulotrichales. A maior parte da literatura da área refere-se à sulfatação química de polissacarídeos de algas vermelhas e pardas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Determinar a estrutura química fina das heteroramnanas sulfatadas obtidas da alga verde *Gayralia brasiliensis* e avaliar a atividade citotóxica destes polissacarídeos sulfatados nativos e modificados quimicamente.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Extrair e purificar as heteroramnanas sulfatadas;
- b) Modificar quimicamente a heteroramnana sulfatada nativa através de sulfatação química;
- c) Determinar a estrutura química das heteroramnanas sulfatadas nativa, purificada e oversulfatada através de métodos químicos e espectroscópicos;
- d) Avaliar o efeito citotóxico da heteroramnana sulfatada nativa e quimicamente sulfatada em modelos tumorais humanos de glioblastoma (U87MG) e melanoma metastático (WM9);
- e) Estabelecer correlações estrutura-atividade da heteroramnana sulfatada nativa e seu produto oversulfatado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALGAS MARINHAS

Algas são organismos simples e fotossintéticos, que podem ser divididos em dois grandes grupos: microalgas (unicelulares) e macroalgas (multicelulares). Seus tamanhos variam entre 3 e 10 μm (microalgas) a até 70 m (macroalgas). Estes organismos são encontrados em ambientes aquáticos, tais como oceanos, rios e lagos, em águas residuais, no solo, e minoritariamente em animais e plantas (como simbioses). As macroalgas habitam majoritariamente a zona litorânea, e como organismos fotossintéticos, são de grande importância ecológica uma vez que desenvolvem um papel-chave como produtores primários da cadeia alimentar marinha (CHAN *et al.*, 2006; GAMAL, 2010; WEI *et al.*, 2013).

De acordo com a pigmentação, as macroalgas são classificadas em 3 grandes filos: algas pardas (Phaeophyta), vermelhas (Rhodophyta) e verdes

(Chlorophyta) (CHAN *et al.*, 2006; KHAN *et al.*, 2009; GAMAL, 2010). São ricas fontes de proteínas, ácidos graxos poliinsaturados, minerais essenciais, vitaminas, antioxidantes e polissacarídeos sulfatados, e por isso têm sido exploradas pelas indústrias farmacêutica, cosmética, de alimentos e fertilizantes. Ainda, algumas espécies são capazes de remover metais pesados da água e podem ser utilizadas como potenciais biorremediadores (CHAN *et al.*, 2006; WIJESEKARA *et al.*, 2011; PISE *et al.*, 2012). A quantidade desses polissacarídeos e suas estruturas químicas gerais diferem de acordo com as três principais divisões: as algas vermelhas produzem principalmente galactanas sulfatadas e agaranas, as pardas produzem fucoidanas, alginatos e laminaranas. As algas verdes produzem ulvanas sulfatadas e ramnanas sulfatadas, além de outros tipos estruturais de polissacarídeos (WIJESEKARA *et al.*, 2011).

As algas pardas apresentam predominantemente os pigmentos fucoxantina e xantofila, e menores quantidades de clorofila *a* e *c*, e β -caroteno. Seu principal carboidrato de reserva é a laminarina e na parede celular podem ser encontradas celulose e alginatos. Os gêneros *Ascophyllum* sp., *Fucus* spp., *Laminaria* spp., *Sargassum* spp., *Turbinaria* spp. são os mais utilizados em agricultura como biofertilizantes (KHAN *et al.*, 2009; GAMAL, 2010).

As algas vermelhas apresentam predominantemente ficoeritrina e ficocianina como pigmentos, e sua parede celular é composta por celulose, ágar e carragenanas. Estas algas são bastante utilizadas na alimentação da população oriental (nori), e seus polissacarídeos são utilizados como espessantes na indústria alimentícia, e como meio de cultura na indústria biotecnológica (KHAN *et al.*, 2009; GAMAL, 2010).

Algas verdes apresentam esta cor característica devido à presença de clorofila *a* e *b* na mesma proporção de plantas superiores (KHAN *et al.*, 2009; GAMAL, 2010). São ricas em ácido linoleico, um precursor da síntese de prostaglandinas e tromboxanos, que estão envolvidos na modulação das respostas imunológica e inflamatória. O ácido palmítico, esteárico e gama-linoleico são usados nas indústrias farmacêutica, nutracêutica e cosmética (PISE *et al.*, 2012).

2.2 ALGAS VERDES (CHLOROPHYTA)

2.2.1 Características gerais das algas verdes (Chlorophyta)

As algas pertencentes ao filo Chlorophyta compreendem um dos grupos mais diversificados e abundantes, com aproximadamente 1200 espécies distribuídas ao redor do mundo, excluindo-se as microalgas verdes. Alguns de seus representantes são os gêneros *Ulva*, *Caulerpa*, *Codium*, *Enteromorpha*, *Monostroma* e *Gayralia* (PEDRINI, 2011; LELIAERT *et al.*, 2012).

As algas verdes habitam regiões entre marés e submersas, costas e estuários, compreendendo uma faixa de 10 a 200 metros de profundidade, além de serem tolerantes a variações de salinidade. Assim como as algas vermelhas e pardas, as algas verdes também podem ocorrer nos costões rochosos marinhos, entretanto, são mais comuns em substratos não consolidados tais como areia e sedimentos. A coloração das espécies deste filo resulta da predominância das clorofilas *a* e *b* como pigmentos, e seus produtos de reserva são armazenados nos cloroplastos, diferentemente de outras algas eucarióticas (LITTLER, 1989; LEE, 2008; PEDRINI, 2011).

Dentre as principais classes pertencentes ao filo Chlorophyta, encontra-se a classe Ulvophyceae, com aproximadamente 950 espécies. As Ulvophyceae são predominantemente marinhas e bentônicas (fixas a um substrato), porém, podem ser encontradas também em água doce, como é o caso de algumas espécies das ordens Ulotrichales e Cladophorales. No litoral asiático, os gêneros *Caulerpa* e *Monostroma* são cultivados para alimentação humana, gerando produções de até 1500 toneladas por ano, o que acaba por estimular o mercado local (REVIERS, 2006).

A alga utilizada no desenvolvimento deste trabalho chama-se *Gayralia brasiliensis*, e pertence à ordem Ulotrichales. Esta ordem contém cerca de 10 gêneros e 90 espécies (REVIERS, 2006), amplamente distribuídas em águas temperadas e tropicais (LELIAERT *et al.*, 2012; PELLIZZARI *et al.*, 2013). Algumas espécies da ordem, tais como *Monostroma* e *Gayralia*, apresentam importância

econômica para as indústrias alimentícia e cosmética (PELLIZZARI *et al.*, 2007; PISE *et al.*, 2012), e propriedades biológicas tais como atividade antiviral e anticoagulante (CASSOLATO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008). No litoral do Brasil, predominam as espécies do gênero *Gayralia*.

2.2.1.1 Características gerais das algas verdes do gênero *Gayralia*

As algas do gênero *Gayralia* ocorrem na zona entre-marés dos estuários e manguezais da costa brasileira, com maior abundância na região sudeste, e caracterizam-se pelo crescimento predominante na primavera e inverno, ampla tolerância a variações de temperatura, irradiação e salinidade. Inicialmente este gênero era equivocadamente identificado como *Ulvaria* e *Monostroma* (PELLIZZARI *et al.*, 2007; PELLIZZARI *et al.*, 2008; PEDRINI, 2011; PELLIZZARI *et al.*, 2013).

Este gênero tem aplicação econômica na alimentação devido ao seu alto valor nutracêutico, como alternativa ao uso da alga *nori* (*Porphyra* sp.), assim como pode ser utilizado como temperos e compotas (PELLIZZARI *et al.*, 2007; PELLIZZARI *et al.*, 2013). Além disso, algas do gênero *Gayralia* são passíveis de cultivo, através de procedimentos simples de maricultura, o que poderia gerar renda alternativa para moradores costeiros (PELLIZZARI *et al.*, 2007).

A espécie *Gayralia brasiliensis* (Ulotrionales, FIGURA 1), objeto de estudo deste trabalho, apresenta um único talo foliar monostromático, são finas, lisas, apresentam textura gelatinosa, com folhas em formato de lâmina, coloração verde claro, translúcida, que se torna verde escuro após a secagem (LITTLER, 1989; PELLIZZARI *et al.*, 2013).

FIGURA 1 ASPECTO GERAL DA ALGA VERDE *Gayralia brasiliensis*



FONTE:

http://images.algaebase.org/_mediafiles/algaebase/5964B9370a28d25BADKVp337D342/R49yDAP7UcUL.jpg (Acessado em: 03 de dezembro de 2015).

2.2.2 Polissacarídeos sulfatados de algas verdes

Dentre as três principais divisões de algas marinhas, as algas vermelhas e pardas são amplamente exploradas comercialmente no que diz respeito aos polissacarídeos sulfatados que produzem e suas propriedades biológicas e físico-químicas. Os estudos desenvolvidos com estes polissacarídeos constituem um campo de conhecimento bem estabelecido até o presente momento, enquanto o estudo dos polissacarídeos sulfatados das algas verdes (Chlorophyta) representa um recente foco de utilização desta biomassa (ALVES *et al.*, 2013).

As macroalgas verdes sintetizam uma grande variedade estrutural de polissacarídeos sulfatados. Dentre estas, as mais estudadas em termos estruturais são as ulvanas, cuja denominação foi inicialmente atribuída aos polímeros extraídos de *Ulva lactuca* (LAHAYE; AXELOS, 1993; LAHAYE; ROBIC, 2007).

Os primeiros estudos estruturais com os polissacarídeos sulfatados de *Ulva lactuca* foram realizados por Brading *et al* (1954), nos quais foi identificada pela

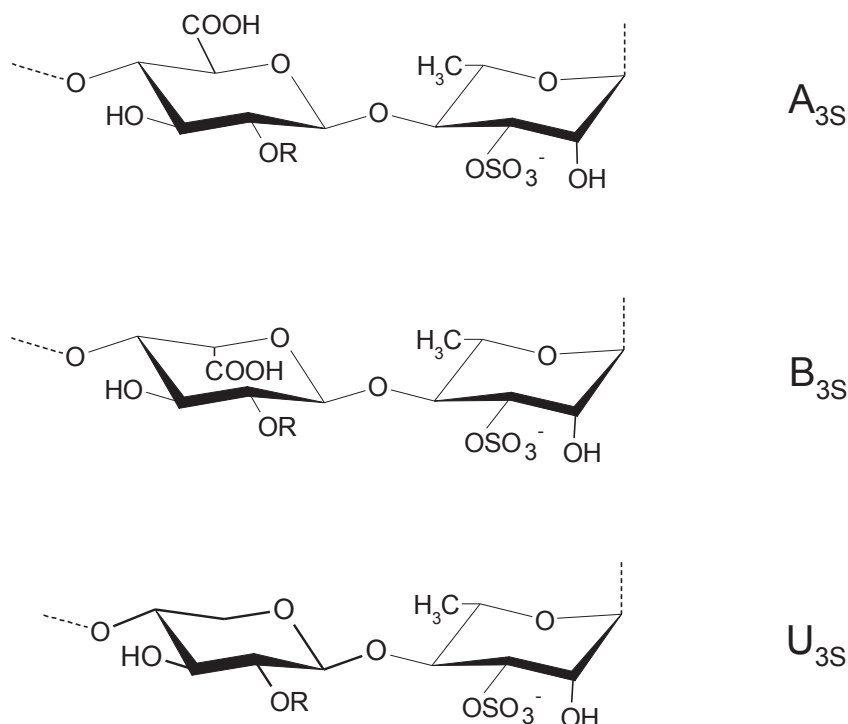
primeira vez a presença de ramnose em polissacarídeos de algas marinhas. Mais tarde foi evidenciada a presença de ácido D-glucurônico, L-idurônico e D-xilose como constituintes do polímero, assim como a presença de grupos sulfato em diferentes posições (BRADING *et al.*, 1954; MCKINNEL; PERCIVAL, 1962; PERCIVAL; WOLD, 1963; LAHAYE; AXELOS, 1993; RAY; LAHAYE, 1995; QUEMENER *et al.*, 1997).

Atualmente o termo “ulvana” tem sido utilizado para se referir aos polissacarídeos de diversas espécies pertencentes à ordem Ulvales, principalmente dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha*. As ulvanas são constituídas majoritariamente por unidades de ácidos urônicos (D-glucurônico e/ou L-idurônico), e os monossacarídeos neutros α -L-ramnose e β -D-xilose (RAY; LAHAYE, 1995; QUEMENER *et al.*, 1997; LAHAYE; ROBIC, 2007).

As principais unidades apresentam-se na forma de dissacarídeos repetitivos denominados de ácido ulvanobiurônico 3-sulfato tipos A e B, os quais são constituídos por $\rightarrow 4$)- β -D-GlcAp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhap-3S-(1 $\rightarrow$ (A_{3S}) e $\rightarrow 4$)- α -L-IdoAp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhap-3S-(1 $\rightarrow$ (B_{3S}), respectivamente. Além disto, xilose pode ser encontrada na cadeia principal ligada à ramnose 3-sulfato ($\rightarrow 4$)- β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhap-3S-(1 $\rightarrow$, sendo denominada de ulvanobiose 3-sulfato (U_{3S}). As unidades de xilose e ácido urônico podem apresentar-se parcialmente sulfatadas na posição 2, ou como ramificações da ramnose 3-sulfato, na posição 2 (RAY; LAHAYE, 1995; RAY; LAHAYE, 1995; LAHAYE; RAY, 1996; LAHAYE *et al.*, 1997; QUEMENER *et al.*, 1997; LAHAYE, 1998; LAHAYE; ROBIC, 2007; DOMOZYCH *et al.*, 2012). A FIGURA 2 exemplifica as principais unidades estruturais citadas acima. Ocasionalmente, pequenas proporções de galactose, glucose, manose e proteínas podem ser detectadas (ROBIC *et al.*, 2009).

Além da ordem Ulvales e Ulotrichales, algumas espécies das ordens Cladophorales e Bryopsidales tiveram seus polissacarídeos estudados. Já foram descritas β -D-mananas sulfatadas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2012), arabinanas, galactanas sulfatadas (e/ou arabinogalactanas sulfatadas) e α -D-glucanas (CIANCIA *et al.*, 2007), xiloarabinogalactanas sulfatadas (RAMANA; RAO, 1991; RAO *et al.*, 1991), ramnogalactoarabinanas (RAO; RAMANA, 1991) e xilomanogalactanas (RAO; RAO, 1986).

FIGURA 2 DISSACARÍDEOS REPETITIVOS PRESENTES NAS ULVANAS



FONTE: O Autor (2017). NOTA: A_{3S} = ácido ulvanobiurônico 3-sulfato. B_{3S} = ácido ulvanobiurônico 3-sulfato. U_{3S} = ulvanobiose 3-sulfato. R = substituição por SO₃⁻² ou H.

Os polissacarídeos sulfatados extraídos de espécies da classe Ulotrichales, principalmente do gênero *Monostroma*, diferem estruturalmente das ulvanas, pelo fato de apresentarem teores significativamente maiores de ramnose e menores de ácidos urônicos e xilose, além de apresentarem diferentes tipos de ligações glicosídicas, tais como ramnoses ligadas nas posições 2 e/ou 3, em diferentes proporções (USOV; ZELINSKI, 2013).

Uma ramnana sulfatada homogênea ($M_w = 1,7 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$) obtida de *Monostroma latissimum*, após degradação controlada de Smith, dessulfatação e metilação, apresentou cadeia principal constituída por ramnose ligada nas posições 3 e 2, em proporção de 3:2, com menores teores de ramnose 2,4 e 3,4 dissustituídas. Grupos sulfato esterificam majoritariamente as posições 3 ou 4 de unidades de ramnose 2 ligadas (LEE *et al.*, 1998). Já as ramnanas sulfatadas obtidas de *Monostroma nitidum* apresentam uma cadeia principal constituída principalmente por unidades de ramnose 3-ligadas e 2-ligadas, com grupos sulfato nas posições 2 e 3, respectivamente. Adicionalmente, unidades de ramnose 2,3-dissustituídas, em baixa porcentagem, estão ramificadas em C-2 com unidades de

glucose 4-ligadas (LEE *et al.*, 2010). De outra espécie do gênero *Monostroma* (*M. nitidum*) foi isolada uma ramnana com massa molecular de $1,8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, a qual apresenta unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas ou não em C-2, 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas (HARADA; MAEDA, 1998).

Os estudos estruturais conduzidos por (MAO *et al.*, 2008) com *M. nitidum* mostraram que as ramnanas sulfatadas apresentam proporções semelhantes de ramnose, porém diferem quanto ao teor e posicionamento de grupos sulfato, tamanhos moleculares e padrão de ligação glicosídica. O primeiro polissacarídeo, denominado WF1 ($8,7 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$; 28,2% SO_4^{-2}), é composto por unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-3 e C-4, e ramnose 4-ligada. Outra ramnana, denominada de WF3 ($7,0 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$; 34,4% SO_4^{-2}) é composta por unidades de ramnose 3-ligada sulfatada em C-2 e C-4, e ramnose 2-ligada sulfatada em C-3 e C-4. Adicionalmente, foi obtida de *M. latissimum* uma ramnana constituída majoritariamente por unidades de ramnose 2-ligadas, podendo apresentar substituições por grupos sulfato nas posições 3 e/ou 4, além de apresentar menor proporção de unidades de ramnose 3-ligadas não sulfatadas e ramnose 2,3-dissubstituídas (MAO *et al.*, 2009).

Li e colaboradores vêm desenvolvendo trabalhos com os polissacarídeos extraídos de *Monostroma* sp. desde 2011. De forma geral, estes polissacarídeos apresentam massa molecular que varia entre $3,3 \times 10^4$ e $5,13 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, teores de sulfato entre 25,7%, 26,6%, altas porcentagens de ramnose (82,7% a 98,7%), e menores proporções de xilose (traços a 4,8%), glucose (4,6%), galactose (traços a 2,6%), manose (1,9% a 3,1%) e ácido glucurônico (2,4 a 3,9%) (LI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017). Quanto ao padrão de ligação glicosídica, os polímeros são constituídos majoritariamente por unidades de ramnose 3-ligadas, 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas, em diferentes proporções (4:1:1; 13,9:3,7:3,5; 1,00:0,74:0,50). As unidades 3-ligadas podem ou não apresentar substituições por grupos sulfatos em C-2, e as unidades 2-ligadas podem ou não encontrar-se substituídas por sulfato em C-3 (LI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017). Adicionalmente, aproximadamente 25% das unidades 3-ligadas estão ramificadas em C-2 por unidades 3-ligadas ou 2-ligadas, sulfatadas ou não (LI *et al.*, 2012).

No laboratório de Glicobiologia Estrutural de Carboidratos de Algas Marinhas (GLICAM) do Departamento de Bioquímica da UFPR, os polissacarídeos obtidos de

algas do gênero *Gayralia* foram pela primeira vez submetidos a estudos estruturais e de atividade biológica.

A macroalga *Gayralia oxysperma* sintetiza heteroramnanas sulfatadas como principal polissacarídeo solúvel em meio aquoso. Análises químicas e espectroscópicas demonstram que a heteroramnana homogênea de $1,519 \times 10^6$ g.mol⁻¹ é constituída por unidades de α -L-ramnose 3-, 2- e 2,3- ligadas (1,0:0,43:0,38). As unidades 3-ligadas podem ser sulfatadas em C-2 e C-4 (38 e 29%, respectivamente), e as unidades 2- ligadas podem ser sulfatadas em C-3 ou C-4 (22%). Além disto, a heteroramnana é parcialmente ramificada, apresentando um ponto de ramificação a cada 5 unidades de ramnose, sendo estas ramificações compostas por ácido glucurônico 2-sulfato, ácido galacturônico 2-sulfato ou xilose (CASSOLATO *et al.*, 2008).

Nos estudos estruturais conduzidos por (CASSOLATO *et al.*, 2008), a heteroramnana sulfatada e homogênea foi submetida à degradação controlada de Smith, com a finalidade de se obter o polímero livre das cadeias laterais e assim determinar a composição da cadeia principal. Neste processo, o polímero foi oxidado com *m*-periodato de sódio e posteriormente submetido à hidrólise ácida parcial, promovendo a remoção das cadeias laterais e a clivagem de algumas unidades da cadeia principal, as quais são susceptíveis à oxidação (por exemplo, as unidades de ramnose 2-ligadas, presentes em baixa porcentagem).

O produto obtido a partir da degradação controlada de Smith apresenta maior teor de grupos sulfato quando comparado ao polissacarídeo de origem. Isto ocorre porque as unidades de ramnose 3-ligadas (sulfatadas ou não), bem como as unidades de ramnose 2-ligadas (sulfatadas), não são susceptíveis à oxidação com periodato. Desta forma, além da importância nos estudos estruturais, o processo de degradação controlada de Smith origina moléculas mais sulfatadas e com menor massa molecular que o polímero de origem, as quais podem apresentar propriedades biológicas interessantes.

Posteriormente, este processo foi utilizado com o extrato bruto contendo heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma*, e diferentes produtos foram obtidos. Após purificação, as frações de maior rendimento denominadas OX-6Sb ($1,093 \times 10^5$ g.mol⁻¹) e OX-6Sc ($2,511 \times 10^5$ g.mol⁻¹) apresentam características estruturais distintas em relação à proporção de unidades de ramnose 3- e 2-ligadas, e também diferem no teor e posição dos grupos sulfato ao longo da cadeia. As unidades 3-

ligadas estão sulfatadas em C-2 (36 e 31%, respectivamente), C-4 (25 e 42% respectivamente), e em C-2 e C-4 (7%). Já as unidades de ramnose 2-ligadas apresentam sulfato em C-4 (59 e 46%, respectivamente), e em C-3 e C-4 (20 e 45%, respectivamente) (ROPELLATO *et al.*, 2015).

As heteroramnanas sulfatadas presentes no extrato bruto da alga verde *Gayralia brasiliensis* (GB) e seus produtos de degradação controlada de Smith (GBH-S) foram caracterizadas parcialmente quanto à sua estrutura química (BERTÉ, 2013). Estes polímeros são sulfatados (29,4 e 38,2% de grupos sulfato, respectivamente), contém ácidos urônicos (9,1 e 6,6%, respectivamente) e são constituídos pelos monossacarídeos neutros ramnose (64,0 e 78,2%, respectivamente), glucose (14,5 e 19,8%, respectivamente), xilose (14,7 e 1,9%, respectivamente) e galactose (6,7% para GB). As heteroramnanas sulfatadas nativas e os produtos de degradação controlada de Smith de *G. brasiliensis* foram avaliadas quanto ao potencial anticoagulante, antiviral e anti-angiogênico, como será abordado no item 2.4 (BERTÉ, 2013). Em continuação aos estudos com os polissacarídeos produzidos pela alga *G. brasiliensis*, neste trabalho foi determinada a estrutura química fina destes polímeros, assim como o seu potencial antitumoral.

A TABELA 1 descreve as estruturas químicas dos polissacarídeos de algumas espécies da ordem Ulotrichales.

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES DA ORDEM ULOTRICHALES

Espécie	Tipo de extração	Composição monossacarídica^b	Grupos sulfato (%)	Ácidos urônicos (%)	Massa molecular (Mw em g.mol⁻¹)	Tipos de ligação^a
¹ <i>Monostroma latissimum</i>	Aquosa a quente	85,4% Rha; 1,4% Ara; 5,2% Xyl; 1,3% Man; 4,7% Glc; 2,0% Gal	7,2	4,0	1,7 x 10 ⁵	Rha 3L e 2L (3:2); Rha 2L3S e Rha 2L4S
² <i>Monostroma nitidum</i>	Aquosa a quente	Rha; traços de Glc e Xyl; GlcA	31,7	4,6	2,03 x 10 ⁴	Rha 2L3S e 3L2S (1:2); Rha 2,3L e Glc 4L
³ <i>Monostroma nitidum</i>	Aquosa a quente	<u>WF1</u> : 79,4% Rha; 5,2% Xyl; 10,1% Glc; 5,3% Gal <u>WF3</u> : 78,2% Rha; 14,7% Xyl; 3,7% Glc; 3,4% Man	<u>WF1</u> : 28,2 <u>WF3</u> : 34,4	<u>WF1</u> : 7,9 <u>WF3</u> : 6,7	<u>WF1</u> : 8,7 x 10 ⁵ <u>WF3</u> : 7,0 x 10 ⁴	<u>WF1</u> : Rha 2L3,4S; Rha 4L <u>WF3</u> : Rha 3L2,4S; Rha 2L3,4S
⁴ <i>Monostroma latissimum</i>	Aquosa a quente	86,7% Rha; 6,29% Xyl; 6,94% Glc	23,5	3,2	5,5 x 10 ⁴	Rha 2L3S/2L4S/2L3,4S Rha 3L; Rha 2,3L
⁵ <i>Monostroma latissimum</i>	Aquosa a quente	84,0% Rha; 4,8% Xyl; 4,6% Glc; 2,3% Gal; 1,9% Man; 2,4% GlcA	26,1	n.d.	5,13 x 10 ⁵	Rha 3L; 2L; 2,3L (4:1:1) Rha 3L2S; Rha 2L3S
⁶ <i>Monostroma latissimum</i>	Aquosa a quente	82,7% Rha; 4,5% Xyl; 4,6% Glc; 3,1% Man; 2,6% Gal; 2,4% GlcA	25,7	n.d.	3,36 x 10 ⁴	Rha 3L; Rha 3L2S; Rha 2L3S; Rha 2,3L
⁷ <i>Monostroma nitidum</i>	Aquosa a quente	90,0% Rha; 7,3% Xyl; 1,8% Glc	28,0	n.d.	1,8 x 10 ⁵	Rha 3L; Rha 3L2S; Rha 2L; Rha 2,3L
⁸ <i>Monostroma angicava</i>	Aquosa em temperatura ambiente	96,1% Rha; 3,9% GlcA	28,8	5,1	5,84 x 10 ⁴	Rha 3L2S; Rha 2L3S/2L4S; Rha 2,3L; Rha 4L; Rha 2,4L; TNR GlcA2S

⁹ <i>Monostroma angicava</i>	Aquosa a quente	98,7% Rha; traços de Xyl e Gal	26,6	n.d.	8,81 x 10 ⁴	Rha 3L; 2L; 2,3L (1:0,74:0,50); Rha 2L3S
¹⁰ <i>Monostroma latissimum</i>	Aquosa a quente	78,6% Rha; 11,5% Glc; 7,8% Xyl; 2,0% Man	21,2	10,7	7,25 x 10 ⁵	Rha 2L; Rha 3L; Rha 2,3L; Rha 2,4L; Rha 2,3,4L
¹¹ <i>Monostroma oxyspermum</i>	Aquosa a quente	69,3% Rha; 7,8% Fru; 2,3% Gal; 3,0% Xyl; 1,9% Glc	n.d.	n.d.	5,5 x 10 ⁴	n.d.
¹² <i>Gayralia oxysperma</i>	Aquosa a quente	64,0% Rha; 13,0% Xyl; 12,3% GlcA; 6,7% Glc; 2,9% GalA; 1,1% Gal.	25,8	19,0	1,519 x 10 ⁶	Rha 3L; 2L; 2,3L (1:0,43:0,37) Rha 3L4S e 2L4S (37%) Rha 3L2S (27%) Rha 3L2,4S e 2L3,4S (16%) Rha 2,3L4S (50%)
¹³ <i>Gayralia oxysperma</i>	Aquosa a quente	<u>OXSb</u> : 89,6% Rha; 2,0% Xyl; 2,9% Glc; 5,5% GlcA. <u>OXSb</u> : 87,8% Rha; 2,8% Xyl; 3,2% Glc; 6,2 GlcA.	<u>OXSb</u> : 33,5 <u>OXSb</u> : 41,0	<u>OXSb</u> : 5,0 <u>OXSb</u> : 7,0	<u>OXSb</u> : 1,093 x 10 ⁵ <u>OXSb</u> : 2,511 x 10 ⁵	<u>OXSb</u> : Rha 3L e 2L monosulfatada, dissulfatada e não sulfatada (1:0,18:0,45) <u>OXSb</u> : Rha 3L e 2L monosulfatada, dissulfatada e não sulfatada (1:0,47:0,32)
						GlcA 4L (não sulfatado ou 2S)

^a / = e/ou. L = o número à esquerda da letra L refere-se à posição da ligação glicosídica. ⁹ Rha = rarnnose. Xyl = xylose. Glc = glucose. Gal = galactose. GlcA = ácido glucurônico. Ara = arabinose. Man = manose. O número à esquerda do nome de cada espécie refere-se à referência bibliográfica. ¹ (LEE *et al.*, 1998). ² (LEE *et al.*, 2010). ³ (MAO *et al.*, 2008). ⁴ (MAO *et al.*, 2009). ⁵ (LI *et al.*, 2011). ⁶ (LI *et al.*, 2012). ⁷ (HARADA; MAEDA, 1998). ⁸ (LIU *et al.*, 2017). ⁹ (LI *et al.*, 2017). ¹⁰ (ZHANG *et al.*, 2008). ¹¹ (SEEDEVI *et al.*, 2015). ¹² (CASSOLATO *et al.*, 2008). ¹³ (ROPELLATO *et al.*, 2015).

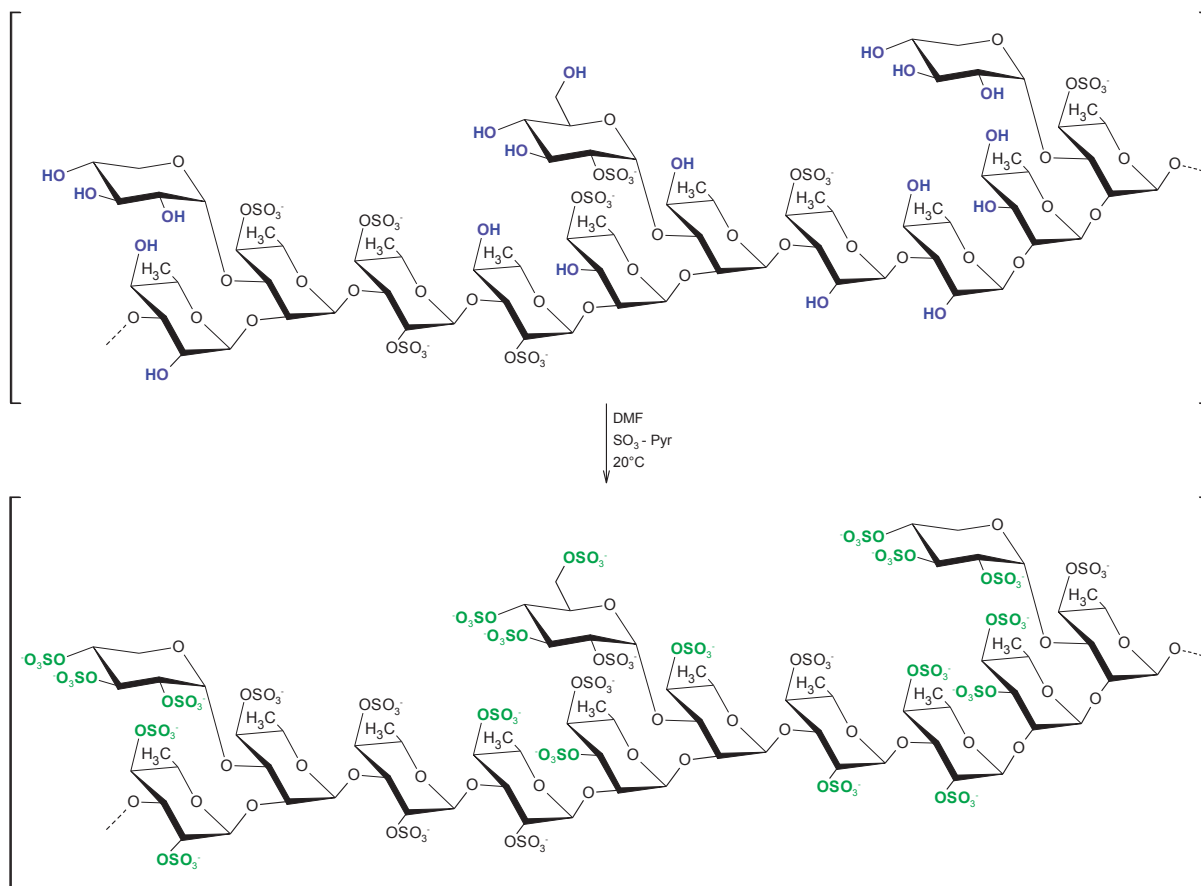
2.3 MÉTODOS DE SULFATAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Macromoléculas de origem poli-aniônica tais como os polissacarídeos sulfatados produzidos por algas marinhas, são amplamente estudados quanto ao seu potencial biológico, devido às interações que podem ter com outras moléculas de carga oposta. Neste contexto, o teor e o posicionamento de grupos sulfato ao longo da cadeia polissacarídica tem participação importante no reconhecimento entre moléculas refletindo maior ou menor efeito biológico, e tornando de grande relevância o estudo da relação entre estrutura química e atividade. As reações de sulfatação química de polissacarídeos são realizadas em polímeros previamente caracterizados, e tem como objetivos melhorar as propriedades biológicas já constatadas, facilitar o entendimento de seus mecanismos de ação, e eventualmente produzir análogos de agentes terapêuticos já existentes (PAPY-GARCIA *et al.*, 2005; MESTECKINA; SHCHERBUKHIN, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Não há um método universal para síntese de polissacarídeos sulfatados descrito na literatura, uma vez que estes apresentam uma diversidade estrutural muito grande – diferentes tipos de ligação glicosídica, massas moleculares, configuração das ligações, grau e posicionamento de grupos substituintes, e composição monossacarídica. Além disso, existem variações inerentes aos métodos, tais como os tipos de agentes sulfatantes, meio reacional, tempo e temperatura de reação, e proporção dos reagentes, os quais podem influenciar na eficiência da sulfatação (MESTECKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

As reações de sulfatação química são conduzidas com o polissacarídeo dissolvido em um solvente orgânico (dimetilformamida, DMF; dimetilsulfóxido, DMSO; formamida, FA; ou piridina, Pyr), ao qual vagarosamente é adicionado o agente sulfatante (ácido clorosulfônico, ClSO_3H ; ou complexo trióxido de enxofre-piridina, $\text{SO}_3\text{-Pyr}$), permitindo a formação de ésteres de sulfato a partir dos grupos hidroxila (O'NEILL, 1955; LARM *et al.*, 1979; AL-HORANI; DESAI, 2010; MESTECKINA; SHCHERBUKHIN, 2010). Um exemplo da reação é mostrado na FIGURA 3.

FIGURA 3 ESQUEMA HIPOTÉTICO DE PERSULFATAÇÃO DE UMA HETERORAMNANA



FONTE: O Autor (2017).

O ClSO₃H apresenta muitos efeitos indesejáveis durante a reação, tais como clivagem de grupos funcionais, taxas de sulfatação não reprodutíveis e degradação do polímero. Como tentativa de limitar o caráter altamente ácido do ClSO₃H, a piridina tem sido empregada como solvente, entretanto o grau de despolimerização permanece alto e a ligação da piridina aos terminais redutores dos polissacarídeos dificulta sua posterior eliminação do meio reacional (PAPY-GARCIA *et al.*, 2005).

Por outro lado, o complexo SO₃-Pyr é o mais utilizado para sulfatação de carboidratos na presença de solventes apróticos tais como DMF, DMSO ou Pyr. Entretanto, sua instabilidade e seu caráter altamente ácido quando dissolvidos em solventes orgânicos promovem clivagem de grupos e despolimerização parcial. Este problema pode ser minimizado pela adição de 2-metil-2-butenol, um sequestrador de grupos ácidos. A presença deste composto durante a reação evita as reações indesejáveis (PAPY-GARCIA *et al.*, 2005; AL-HORANI; DESAI, 2010).

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS VERDES

Devido à grande diversidade estrutural dos polissacarídeos produzidos por macroalgas marinhas, seja pela composição monossacarídica, grau de sulfatação, posição dos grupos sulfato, tipos de ligações glicosídicas, enantiomericidade e massa molecular, estes polímeros desempenham diferentes atividades biológicas de interesse na área biomédica.

Dentre as atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas verdes destacam-se as atividades anticoagulante (MAO *et al.*, 2009), antioxidante (QI *et al.*, 2005), anti-hiperlipidêmica (PENGZHAN *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2012), antitumoral (JIAO *et al.*, 2009; ROPELLATO *et al.*, 2015), imunomoduladora (LEIRO *et al.*, 2007) e antiviral (LEE *et al.*, 1999; GHOSH *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; CASSOLATO *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010).

Na TABELA 2 foram resumidos os principais trabalhos relacionados à atividades biológicas apresentadas por polissacarídeos sulfatados de algas pertencentes à ordem Ulotrichales (gêneros *Monostroma* e *Gayralia*).

TABELA 2 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS VERDES DA ORDEM ULOTRICHALES

Espécie	Atividade biológica	Mecanismo de ação	Características do polissacarídeo
¹ <i>M. latissimum</i>	Anticoagulante	Inibição da atividade da trombina	Ramnanas sulfatadas 7,2% sulfato; 4% ácido urônico
² <i>M. latissimum</i>	Anticoagulante	Inibição da via intrínseca e comum da coagulação, e da atividade da trombina (10-20 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas 23,6% sulfato; 3,24% ácido urônico
³ <i>M. latissimum</i>	Anticoagulante	Inibição da via intrínseca e comum da coagulação, e da atividade da trombina (16 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas 26,1% sulfato
⁴ <i>M. latissimum</i>	Anticoagulante	Inibição da via intrínseca e comum da coagulação, e da atividade da trombina (10-50 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas 25,7% sulfato
⁵ <i>M. latissimum</i>	Anticoagulante	Inibição da via intrínseca e comum da coagulação (200 µg.mL ⁻¹), e da atividade da trombina (100 e 200 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas 21-27% sulfato; 10-14% ácido urônico
⁶ <i>M. nitidum</i>	Antitumoral e imunoestimulante	Redução da viabilidade celular de células de carcinoma gástrico humano AGS (35 a 75,4%, 500 µg.mL ⁻¹) e cervical HeLa (< 40%, 500 µg.mL ⁻¹). Estímulo de macrófagos murinos (Raw 264.7) através do aumento da liberação de NO (> 40 µM, 50 µg.mL ⁻¹) e PGE ₂ (0,1-11 ng.mL ⁻¹ , 0,5-10,0 µg.mL ⁻¹)	Polissacarídeos sulfatados constituídos por quantidades variáveis de ramnose e glucose. 10,5-17,7% sulfato; 13,3-21,8% ácido urônico
⁷ <i>M. nitidum</i>	Anticoagulante	Inibição da via intrínseca e comum da coagulação, e da atividade da trombina (15-200 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas; 28,2-34,4% sulfato 6,76-7,92% ácido urônico
⁸ <i>M. nitidum</i>	Antiviral	Anti HSV-2 (IC ₅₀ = 0,87 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas 31,7% sulfato; 4,6% ácido urônico
⁹ <i>M. nitidum</i>	Anticoagulante	Inibição da atividade da trombina	Ramnanas sulfatadas; 28% sulfato
¹⁰ <i>M. angicava</i>	Anticoagulante	Inibição da via intrínseca e comum da coagulação (150 µg.mL ⁻¹), e da atividade da trombina (100 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas; 26,6% sulfato

¹¹ <i>M. angicava</i>	Anti-diabética Anticoagulante	Estímulo do consumo de glucose e diminuição do acúmulo de lipídeos em células HepG2. Inibição da via intrínseca e comum da coagulação (50 µg.mL ⁻¹), e da atividade da trombina (200 µg.mL ⁻¹). Fibrinolítico e trombolítico.	Ramnanas sulfatadas (96,1% Rha; 3,9% GlcA) 28,8% sulfato; 5,1% ácido urônico; 58,4 g.mol ⁻¹
¹² <i>M. oxyspermum</i>	Antioxidante	Antioxidante total (66,3%, 250 µg.mL ⁻¹) DPPH (66,8%, 160 µg.mL ⁻¹) ABTS (83,8%, 125 µg.mL ⁻¹) Poder redutor (15,8%, 400 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas 7,8% ácido urônico
¹² <i>M. oxyspermum</i>	Anticoagulante	Inibição da via intrínseca e comum da coagulação, e da atividade da protrombina (25 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas 7,8% ácido urônico
¹³ <i>G. oxysperma</i>	Antiviral	Anti HSV-1 (IC ₅₀ = 0,27-0,3 µg.mL ⁻¹) Anti HSV-2 (IC ₅₀ = 0,036-0,054 µg.mL ⁻¹)	Ramnanas sulfatadas 25,8-30,9% sulfato; 16,2-19% ácido urônico.
¹⁴ <i>G. oxysperma</i>	Antitumoral	Redução da viabilidade de células de glioblastoma humano U87MG (26,6-48,8%, 100 µg.mL ⁻¹); aumento do número de células na fase G ₁ e dos níveis de mRNA p53 e p21	Heteroramnanas sulfatadas submetidas à degradação controlada de Smith; 33,5-41,0% sulfato; 5,0-7,0% ácido urônico.
¹⁵ <i>G. oxysperma</i>	Anti-leishmanicida	Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (50%, 10 µg.mL ⁻¹). Aumento da produção de NO em macrófagos murinos (Raw 264.7) em 120%, 2,5 µg.mL ⁻¹ . Redução da produção de ânion superóxido (97%, 100 µg.mL ⁻¹).	Heteroramnanas sulfatadas; 26,1% sulfato; 17,0% ácido urônico.
¹⁶ <i>G. brasiliensis</i>	Antiviral, anticoagulante e anti-angiogênica	Anti HSV-1 (IC ₅₀ = 1,2 µg.mL ⁻¹) e anti HSV-2 (IC ₅₀ = 0,78 µg.mL ⁻¹). Ação anticoagulante máxima >200s (APTT, TT, TP: 40-100 µg.mL ⁻¹). Inibição de 100% da formação de vasos sanguíneos (420 e 380 µg).	Heteroramnanas sulfatadas nativas (29,4% sulfato) e produtos de degradação controlada de Smith (38,2% de sulfato).

O número à esquerda do nome de cada espécie refere-se à referência bibliográfica. ¹ (LEE et al., 1998). ² (MAO et al., 2009). ³ (LI et al., 2011). ⁴ (LI et al., 2012). ⁵ (ZHANG et al., 2008). ⁶ (KARNJANAPRATUM; YOU, 2011). ⁷ (MAO et al., 2010). ⁸ (LEE et al., 2008). ⁹ (HARADA; MAEDA, 1998). ¹⁰ (LI et al., 2017). ¹¹ (LIU et al., 2017). ¹² (SEEDEVI et al., 2015). ¹³ (CASSOLATO et al., 2008). ¹⁴ (ROPELLATO et al., 2015). ¹⁵ (KANGUSSU-MARCOLINO et al., 2015). ¹⁶ (BERTÉ, 2013).

As ramnanas sulfatadas produzidas por *M. latissimum* tem sido estudadas quanto à sua atividade anticoagulante, a qual é avaliada através de testes *in vitro* baseados no tempo de coagulação da tromboplastina ativada (aPTT) e da trombina (TT). Na presença de diferentes concentrações dos polissacarídeos sulfatados (10 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) o APTT e TT são prolongados para tempos comparáveis com a heparina (controle positivo e atual terapia anticoagulante). O aumento no aPTT indica a inibição das vias comum/intrínseca, enquanto o aumento no TT sugere inibição da atividade da trombina (enzima que converte o fibrinogênio em fibrina), ou a polimerização da fibrina. Esses polissacarídeos apresentam teores variados de sulfato (7,2% a 27%) e ácidos urônicos (3% a 14%). Resultados semelhantes de atividade anticoagulante foram observados para as ramnanas sulfatadas obtidas de diferentes espécies como *M. nitidum*, *M. angicava* e *M. oxyspermum* (HARADA; MAEDA, 1998; MAO *et al.*, 2008; SEEDEVI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017). As diferenças na atividade anticoagulante estão diretamente relacionadas às estruturas químicas destes polímeros, principalmente no que diz respeito ao teor e posicionamento de grupos sulfato, tipo da ligação glicosídica e massa molecular (LEE *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012).

Adicionalmente, uma ramnana sulfatada homogênea ($M_w = 2,03 \times 10^4$ g.mol $^{-1}$; 31,7% de sulfato) obtida de *M. nitidum* apresentou potente atividade antiviral contra o vírus da herpes simplex tipo 2 (HSV-2), quando adicionado ao meio durante a infecção e incubação do vírus, ou imediatamente após a infecção viral, com valores de IC_{50} de 0,87 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados sugerem que os principais alvos da atividade antiviral desempenhada por esta ramnana sulfatada são as fases de adsorção e/ou penetração do vírus na superfície da célula hospedeira, sendo o polissacarídeo considerado potente agente preventivo contra a infecção por HSV-2 (LEE *et al.*, 2010).

Além disso, as ramnanas sulfatadas de *M. oxyspermum* apresentaram potencial antioxidante. Os antioxidantes comumente utilizados na indústria alimentícia são o BHA (butylated hydroxy anisole) e o BHT (butylated hydroxy toluene), entretanto estudos tem mostrado que podem causar danos ao fígado e carcinogênese. Portanto é de grande importância a busca por antioxidantes naturais sem tais efeitos adversos. Os polissacarídeos sulfatados de *M. oxyspermum* apresentaram 33,2 a 66,3% de atividade antioxidante total (concentrações variando

entre 50 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 22,4 a 68,2% de atividade sequestradora do radical DPPH (concentrações variando entre 10 e 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 25,37 a 76,81% de atividade sequestradora do radical ABTS (concentrações variando entre 25 e 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e 1,02 a 15,81% de poder redutor (concentrações entre 50 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (SEEDEVI *et al.*, 2015).

Estudos realizados no nosso grupo de pesquisa com as heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* demonstraram que estes polímeros apresentam grande potencial biológico. Heteroramnanas nativas e purificadas exibiram atividade anti-herpética *in vitro* com valores de IC_{50} variando entre 0,27 a 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para HSV-1 e valores 10 vezes menores (0,036 a 0,054 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) para HSV-2. Estes resultados estão intimamente relacionados às propriedades aniônicas e peso molecular destas macromoléculas, demonstrando que alto peso molecular associado com alto grau de substituição por grupos sulfato (75% das unidades de ramnose e 80% das unidades de ácido urônico) são fatores importantes para a atividade (CASSOLATO *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a heteroramnana nativa de *G. oxysperma* apresenta atividade anti-leishmanicida, através da inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em 50% (concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), o que ocorre em conjunto com o aumento da produção de NO em macrófagos murinos (120%, concentração de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e redução da produção de ânion superóxido (97%, concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (KANGUSSU-MARCOLINO *et al.*, 2015).

As heteroramnanas sulfatadas nativas (GB) e seus produtos de degradação controlada de Smith (GBH-S), obtidos a partir da alga verde *G. brasiliensis*, apresentaram ação anticoagulante máxima (> 200s) frente aos testes de aPTT (100 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), TT (80 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) e TP (100 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Adicionalmente, GB é potencialmente ativa contra os vírus da herpes simplex HSV-1 e HSV-2, com valores de IC_{50} de 1,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (BERTÉ, 2013).

Ainda, GB e GBH-S apresentaram potencial atividade anti-angiogênica, quando avaliadas *in vivo* pelo ensaio da membrana cório-alantóica (CAM) de embriões de galinha (*Gallus domesticus*), inibindo a formação de vasos sanguíneos em 100% nas concentrações de 480 e 320 μg , respectivamente (BERTÉ, 2013).

Sabendo que a variabilidade estrutural dos polissacarídeos sulfatados influencia nas atividades biológicas, modificações químicas que alteram a estrutura

tornaram-se de grande interesse nos últimos anos. Estudos demonstram que modificações químicas em polissacarídeos naturalmente sulfatados, tais como a oversulfatação, podem melhorar seu potencial biológico, devido às mudanças no teor e no posicionamento dos grupos sulfato na cadeia polissacarídica. Até o presente momento, a maior parte dos estudos de oversulfatação é realizada com polissacarídeos de algas vermelhas e pardas, sendo poucos os trabalhos publicados com algas verdes, e nenhum com algas verdes da ordem Ulotrichales. A TABELA 3 reúne os principais trabalhos encontrados.

Como pode ser observado na TABELA 3, os polissacarídeos oversulfatados de algas pardas apresentam majoritariamente atividades anti-angiogênica, antitumoral e anticoagulante (NISHINO; NAGUNO, 1992; SOEDA *et al.*, 2000; KOYANAGI *et al.*, 2003; TERUYA *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2013). As carragenanas apresentam principalmente atividades anticoagulante, antioxidante, antiviral, antitumoral e imunoestimulante (YAMADA *et al.*, 1997; YUAN *et al.*, 2005; OPOKU *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2006; YUAN *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2014). Enquanto que os polissacarídeos de algas verdes, tanto ulvanas como arabinanas, apresentam atividade antioxidante, anticoagulante, anti-hiperlipidêmica, antiviral e imunoestimulante (QI *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2011; QI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013; SURAYOT *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2017).

O levantamento bibliográfico mostra que os polissacarídeos quimicamente sulfatados potencializam significativamente as atividades biológicas de seus correspondentes nativos, e a discussão abrange apenas o teor destes grupos e o posicionamento dos mesmos ao longo da cadeia polissacarídica, de forma superficial. São poucos os trabalhos que aprofundam o estudo da estrutura química fina dos polímeros modificados, e torna-se difícil estabelecer uma relação definida entre estrutura e atividade. Desta forma, o estudo da estrutura química fina, através de técnicas bem estabelecidas incluindo análise de metilação, dessulfatação, trideuteriometilação e ressonância magnética nuclear, torna-se indispensável para a elucidação da estrutura e, conseqüentemente, para o entendimento dos mecanismos de ação biológica em estudo.

Um dos objetivos deste trabalho foi determinar a estrutura química fina das ramnanas sulfatadas de *Gayralia brasiliensis*, assim como de seu derivado oversulfatado, a fim de estabelecer correlações entre a estrutura destes polímeros,

grau de sulfatação, posicionamento dos grupos sulfato, e o efeito citotóxico contra as linhagens tumorais de glioblastoma (U87MG) e melanoma (WM9).

TABELA 3 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS OVERSULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS

Fonte	Atividade biológica	Ação	Características gerais do polissacarídeo
¹ <i>Fucus vesiculosus</i>	Anti-angiogênica	Inibição da migração de células HUVEC na presença de bFGF (68%, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), da formação do tubo capilar (31%, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Aumento da liberação de PAI-1 (1,7x mais)	Fucoidanas (52,4% sulfato) (sem dados de estrutura química fina)
² <i>Ecklonia kurome</i>	Anticoagulante	Atividade de APTT e TT aumentadas em 110-119% e 108-140%, respectivamente, em relação às fucanas nativas. Aumento da atividade da antitrombina	Fucanas (sem dados de estrutura química fina)
³ <i>Cladosiphon okamuranus</i>	Antitumoral	Diminuição da proliferação de células de leucemia humana (U937) em 80% (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), com indução de apoptose via caspase 3 e 7	Fucoidanas (32,8% sulfato). Sulfatação das unidades de L-Fuc em C2 e C4, apenas C2, e apenas C4, determinados por RMN de ^1H .
⁴ <i>Fucus vesiculosus</i>	Anti-angiogênica	Inibição da proliferação (59,5%, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e da migração na presença de bFGF (46,3%, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de células HUVEC. 100% de inibição da formação do tubo capilar (400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).	Fucoidanas (41,7% sulfato). Sulfatação das unidades de L-Fuc em C2 e em C4, determinado por FT-IR.
⁵ <i>Fucus vesiculosus</i>	Anti-angiogênica e antitumoral	Inibição da proliferação e da migração de células HUVEC na presença de VEGF (~30% com 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e ~40% com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente), através da inibição da via de sinalização por VEGF. Redução do crescimento de tumores <i>in vivo</i> (carcinoma de pulmão de Lewis e melanoma B16).	Fucoidanas (56,7% sulfato) (sem dados de estrutura química fina)
⁶ <i>k-carragenana comercial (Sigma)</i>	Anticoagulante	Após modificação química: aumento da atividade anticoagulante pelo teste do PT em 30x; aumento da	k-carragenana (28,5% sulfato) Sulfatação em C4 e C6, determinado por IR.

atividade de t-PA em 3x.		
⁷ <i>k-carragenana comercial</i> (Sigma)	Antiviral	Inibição da replicação do vírus HIV (IC ₁₀₀ = 7,8 µg.mL ⁻¹) λ-, κ- e ι-carragenanas (sem dados de estrutura química fina)
⁸ <i>k-carragenana comercial</i> (Yantai Algae Industries)	Antioxidante	Sequestro do radical superóxido (92,8%, 400 µg.mL ⁻¹) k-carragenanas (47,9% sulfato). Sulfatação em C6 e C2 das unidades de G4S, determinados por FTIR e RMN de ¹³ C.
⁹ <i>k-carragenana comercial</i> (Yantai Algae Industries)	Antioxidante e citoprotetora	Poder redutor e atividade antioxidante total; Proteção de linfócitos T contra morte celular induzida por H ₂ O ₂ e exposição a radiação UVA (66,7 a 2000 µg.mL ⁻¹) k-carragenanas (47,9% sulfato). Sulfatação em C6 e C2 das unidades de G4S, determinados por FTIR e RMN de ¹³ C.
¹⁰ <i>k-carragenana comercial</i> (Wiejia)	Citotóxica	Redução da viabilidade de células HUVEC (50%, 600 µg.mL ⁻¹) k-carragenanas (38,5% sulfato) e agarose (35,3% sulfato). Sulfatação em G-6, A-2, G-4 e G-2 da agarose, e G-6, A-2 e G-2 da carragenana
¹¹ <i>Kappaphycus striatum</i>	Imunoestimulante e antitumoral	Inibição do crescimento do tumor Sarcoma S180 <i>in vivo</i> (54, 12%, 200 µg/g/dia), com aumento da atividade de células NK (>76, 1%) k-carragenanas (47,9% sulfato)
¹² <i>Ulva pertusa</i>	Antioxidante	Sequestro do radical superóxido (88-95%, 23 µg.mL ⁻¹) Sequestro do radical hidroxil (75-95%, 1,60 mg.mL ⁻¹) Poder redutor (entre 15-35%, 1,6 mg.mL ⁻¹) Ulvanas (23,5-32,8% sulfato) (sem dados de estrutura química fina)
¹³ <i>Ulva pertusa</i>	Anti-hiperlipidêmica	Diminuição dos níveis de triglicerídeos (28, 1%) e LDL (28,4%) <i>in vivo</i> , concentração de 250 mg/kg Ulvanas (32,8%). Sulfatação parcial em C2 de unidades de Rha-4L3S (ligadas a GlcA e IdoA) e IdoA-4L, e em C3 de unidades de IdoA-4L, determinados por IR e RMN de ¹³ C

¹⁴ <i>Enteromorpha linza</i>	Antioxidante	Sequestro do radical superóxido ($EC_{50} = 10,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) Sequestro do radical hidroxil ($EC_{50} = 1,58 \text{ mg.mL}^{-1}$) Sequestro do radical DPPH (90%, $2,21 \text{ mg.mL}^{-1}$)	Ulvana (35,6% sulfato) (sem dados de estrutura química fina)
	Anticoagulante e antioxidante	Sequestro do radical superóxido ($89,7\%$, $41 \mu\text{g.mL}^{-1}$) Sequestro do radical DPPH ($EC_{50} = 0,57 \text{ mg.mL}^{-1}$) Inibição da via intrínseca e extrínseca da coagulação, e da formação de fibrina	Ulvana (34,4% sulfato) Sulfatação em C3 das unidades de Rha 4L, determinado por IR e metilação
	Antiviral	Anti HSV-1 (100% de inibição da infecção viral nos tempos 0h, 1h, 2h, 4h e 8h, concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). $IC_{50} = 28,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Redução da expressão do antígeno HSV-1 em 49% ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ulvana (22% sulfato). Sulfatação em C6 das unidades de Gal e Glc, C2 das unidades de GlcA, determinados por FTIR e RMN de HSQC.
¹⁷ <i>Cladophora glomerata</i>	Imunoestimulante	Indução da liberação de NO por macrófagos murinos Raw 264,7 ($> 34 \mu\text{M}$, 25 a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	Arabinana sulfatada (22% sulfato) (sem dados de estrutura química fina)

O número à esquerda do nome de cada espécie refere-se à referência bibliográfica. ¹ (SOEDA *et al.*, 2000), ² (NISHINO; NAGUNO, 1992), ³ (TERUYA *et al.*, 2007), ⁴ (YU *et al.*, 2013), ⁵ (KOYANAGI *et al.*, 2003), ⁶ (OPOKU *et al.*, 2006), ⁷ (YAMADA *et al.*, 1997), ⁸ (YUAN *et al.*, 2005), ⁹ (YUAN *et al.*, 2006), ¹⁰ (LIANG *et al.*, 2014), ¹¹ (YUAN *et al.*, 2011), ¹² (QI *et al.*, 2005), ¹³ (QI *et al.*, 2012), ¹⁴ (ZHANG *et al.*, 2011), ¹⁵ (WANG *et al.*, 2013), ¹⁶ (LOPES *et al.*, 2017), ¹⁷ (SURAYOT *et al.*, 2016).

2.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR E DESENVOLVIMENTO DE TUMORES

As células normais são equipadas com maquinarias metabólicas e redes de sinalização complexas, reguladas por enzimas que providenciam energia suficiente para sua sobrevivência e proliferação, mantendo a homeostase celular em perfeito funcionamento (JANG *et al.*, 2013).

Estas vias de sinalização intracelular podem ser modificadas em oncogenes e genes supressores de tumor (por aumento de expressão, mutação, deleção e/ou amplificação gênica) e, por sua vez, alterar o metabolismo celular para facilitar o processo tumorigênico. Vias alteradas não somente permitem a adaptação das células ao metabolismo tumoral, mas também são essenciais para a transformação maligna (JANG *et al.*, 2013).

As pesquisas nesta área concentram-se nos eventos celulares e moleculares que permitem a transformação e progressão das células tumorais, promovendo: proliferação descontrolada, evasão da supressão do tumor, inibição da morte celular, criação de um microambiente extracelular através de estímulo da angiogênese, potencial de invasão e metástase. A identificação dos genes envolvidos na tumorigênese é crítico para o estudo do metabolismo tumoral e abre portas para o desenvolvimento de intervenções para o tratamento do câncer (BLANPAIN, 2013).

2.5.1 Vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento tumoral

As principais mudanças metabólicas são resultado de mutações gênicas envolvendo a via PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), Akt e mTOR (*mammalian target of rapamycin*), além dos fatores de transcrição Myc, HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) e SREBP-1 (*steroid response element binding protein 1*) (COLQUHOUN, 2017).

A sinalização via PI3K/Akt é uma das vias principais de sobrevivência em células tumorais. Mutações em PI3K promovem crescimento e proliferação independentes, e facilitam a invasão e metástase. Akt ativada estimula o metabolismo glicolítico em células tumorais, através da indução da expressão do

transportador de glucose GLUT1, aumentando sua captação pelas células. Além disso, ativa a enzima glicolítica fosfofrutoquinase-1 (PFK-1). A sinalização PI3K/Akt pode ser inibida pelo gene supressor de tumor PTEN (*phosphatase and tensin homologue*), entretanto, células tumorais normalmente apresentam perda da função deste gene, levando à perda da regulação da via (MUÑOZ-PINEDO *et al.*, 2012; IURLARO *et al.*, 2014).

Em células normais, a via mTOR controla o crescimento celular e o metabolismo em resposta a estímulos ambientais. Porém, esta via também é uma das mais alteradas no desenvolvimento de tumores, e sua ativação independente é observada em até 80% dos tumores. mTOR ativa a glicólise e a via das pentoses fosfato através da indução de HIF-1, e a lipogênese através da indução do fator de transcrição SREBP (MUÑOZ-PINEDO *et al.*, 2012; IURLARO *et al.*, 2014).

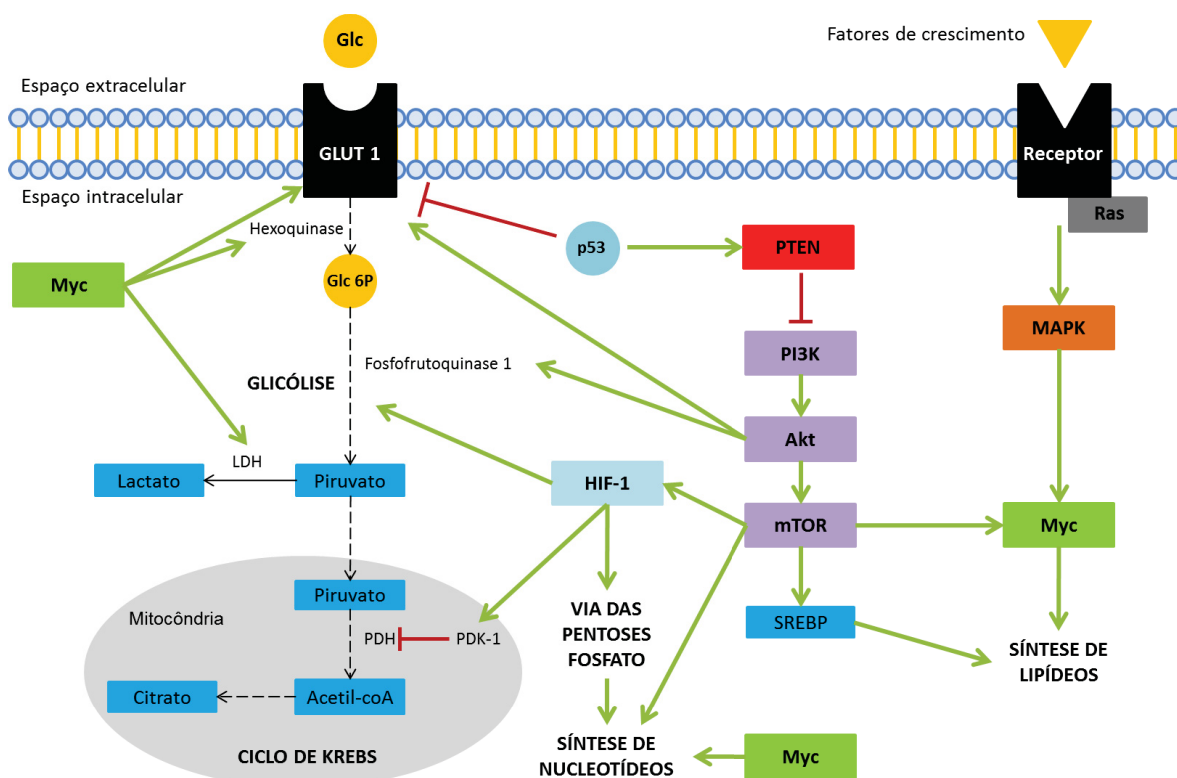
O gene Myc é um fator de transcrição encontrado em altas concentrações nas células tumorais. Sua ativação induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glucose (aumento da expressão de GLUT1, lactato desidrogenase e hexoquinase), nucleotídeos, lipídeos, aminoácidos e proteínas (MUÑOZ-PINEDO *et al.*, 2012; IURLARO *et al.*, 2014).

Variações na concentração de oxigênio são comuns tanto em tecidos normais como no ambiente tumoral. Entretanto, no ambiente tumoral o gradiente de O₂ diminui muito, caracterizando hipóxia. Um dos mecanismos que permite a célula tumoral sobreviver sob hipóxia é mediado através do fator de transcrição HIF-1, que ativa piruvato desidrogenase quinase 1 (PDK1), reduzindo o fluxo de piruvato pelo ciclo de Krebs (MUÑOZ-PINEDO *et al.*, 2012; IURLARO *et al.*, 2014).

Outro fator de transcrição importante para sobrevivência celular é p53. Regula funções como danos ao DNA, apoptose e senescência. Mutações em p53 são encontradas em muitos tumores, e levam a perda do controle do ciclo celular, da apoptose e reparo ineficiente do DNA (IURLARO *et al.*, 2014).

As vias principais descritas acima estão representadas na FIGURA 4.

FIGURA 4 PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO DESENVOLVIMENTO TUMORAL



FONTE: O Autor (2017).

2.5.2 Ciclo Celular

O ciclo celular compreende uma série de eventos organizados e controlados que resulta na divisão de uma célula mãe em duas células filhas. A proliferação das células deve garantir a correta replicação do DNA, e por isso é estritamente regulada por diferentes mecanismos de controle (COLLINS *et al.*, 1997; SHERR; MCCORMICK, 2002; ZHANG; YANG, 2009; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013).

O processo de divisão celular envolve duas fases principais denominadas fase S (síntese do DNA) e fase M (mitose). Estas são intermediadas pelas fases G_1 e G_2 , que precedem a fase S e a fase M, respectivamente. Durante a fase G_1 , a célula é preparada para a síntese de DNA, ou seja, a célula aumenta de tamanho e apresenta $2n$ cromossomos. Durante a fase S, a duplicação do DNA ocorre e ao fim desta fase a célula apresenta $4n$. A fase G_2 caracteriza-se por aumento da célula e

preparo para a divisão, e a fase M compreende a separação em duas células filhas (mitose) (ARELLANO; MORENO, 1997; MADDIKA *et al.*, 2007).

Pelo menos dois processos regulatórios do ciclo celular devem ser destacados: (1) uma cascata de fosforilação de proteínas que desencadeia a transição entre uma fase e outra, e (2) uma série de mecanismos denominados “checkpoints”, responsáveis por garantir que eventos críticos tais como a replicação do DNA e a segregação dos cromossomos ocorram de forma correta, além de manter a ordem dos eventos do ciclo (HARPER; ELLEDGE, 1996; ARELLANO; MORENO, 1997; COLLINS *et al.*, 1997; ZHANG; YANG, 2009; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013).

As proteínas envolvidas no desencadeamento da progressão do ciclo celular fazem parte de uma família de proteínas quinases conhecidas como quinases dependentes de ciclina, ou CDKs, as quais não tem atividade a menos que formem um complexo de ligação com as ciclinas, proteínas específicas expressas somente em momentos específicos do ciclo celular. Adicionalmente, inibidores das quinases dependentes de ciclinas, ou CKIs, podem rearranjar a estrutura dos sítios ativos das CDKs, inativando-as (HARPER; ELLEDGE, 1996; ARELLANO; MORENO, 1997; COLLINS *et al.*, 1997; ZHANG; YANG, 2009; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013).

Assim que uma célula emerge do seu estado quiescente (G_0) em resposta a um estímulo mitogênico, a síntese das ciclinas D1, D2 e D3 são ativadas. A progressão para a fase G_1 é mediada pela associação destas ciclinas às quinases CDK4 e CDK6. Uma vez na fase G_1 , a síntese da ciclina E é ativada e esta se complexa com a CDK2 para que ocorra a transição para a fase S. Na sequência, a síntese de ciclina A é ativada e esta liga-se à CDK1 e CDK2, estimulando a progressão do ciclo para a fase G_2 . Durante a fase G_2 , ocorre a ativação da ciclina B e sua associação com a CDK1, desencadeando uma série de eventos que culmina com a mitose (fase M) (LUNDBERG; WEINBERG, 1999; MADDIKA *et al.*, 2007).

As atividades dos complexos ciclinas/CDK podem ser reguladas por inibidores de CDK, os quais se ligam ao sítio ativo do complexo, rearranjando sua estrutura e levando à perda da atividade. Os complexos CDK/ciclinas D e E são controladas por CKIs da família Cip/Kip, os quais incluem os fatores de transcrição p21, p27 e p57. Além disto, a atividade das CDK/ciclina D pode ser regulada por proteínas da família INK4, que incluem os fatores de transcrição p16, p15, p18 e p19 (SHERR; MCCORMICK, 2002; MADDIKA *et al.*, 2007; ZHANG; YANG, 2009).

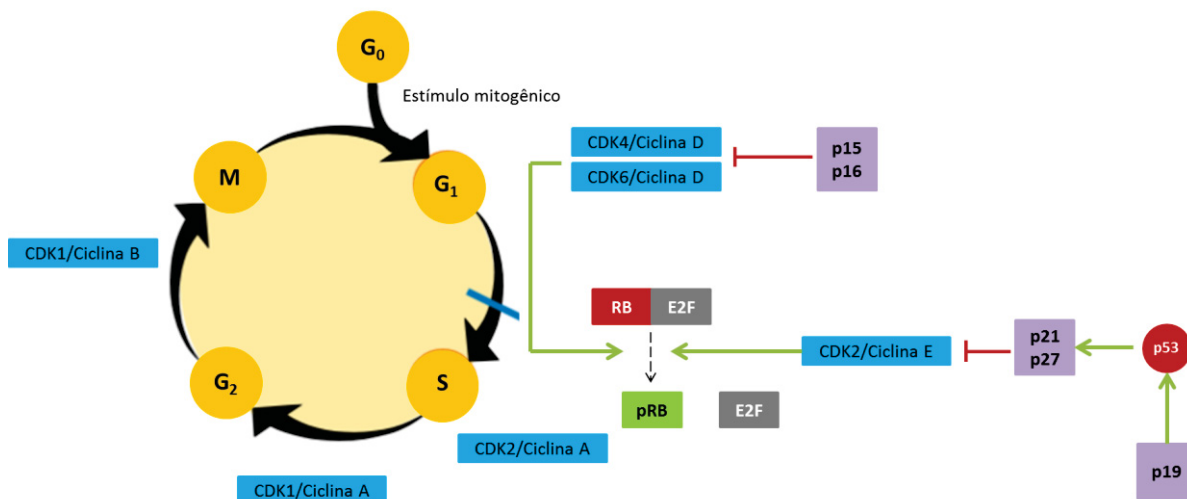
O comportamento coordenado das etapas do ciclo celular também é regulado pelo mecanismo de “checkpoint”. Uma vez na fase G_1 , a célula deve decidir se volta ao seu estado inicial de quiescência, ou se completa o ciclo celular. O ponto de restrição, ou ponto R, funciona como um “interruptor”, o qual é regulado pelos estados fosforilado ou desfosforilado da proteína do retinoblastoma (pRB). Em condições normais pRB é fosforilada e incapaz de formar complexos com fatores de transcrição tais como E2F1, E2F2 e E2F3, permitindo que estes ativem a expressão de genes necessários para a replicação do DNA e progressão do ciclo. A fosforilação parcial de pRB está estritamente relacionada à associação das ciclinas D com as CDK4 e CDK6, e a fosforilação total de pRB depende da associação da ciclina E com CDK2. Quando pRB encontra-se desfosforilada ou hipofosforilada, ocorre formação de complexos entre pRB e os fatores de transcrição E2F e a progressão do ciclo é inibida (LUNDBERG; WEINBERG, 1999; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013).

Um segundo mecanismo de “checkpoint” pode ser ativado, desencadeado pelo fator de transcrição p53. Este fator de transcrição é induzido em resposta a danos no DNA, hipóxia, ou privação de nutrientes, ativando a expressão de genes responsáveis pela parada do ciclo celular ou apoptose, os quais permitem o reparo do dano ou a morte da célula, respectivamente (COLLINS *et al.*, 1997; SHERR; MCCORMICK, 2002; ZHANG; YANG, 2009).

A FIGURA 5 resume as 4 fases do ciclo celular, e como são reguladas pelos diferentes mecanismos descritos acima.

Levando em consideração que uma das principais características das células tumorais é a proliferação celular descontrolada, não surpreende o fato de que proteínas chave descritas nos mecanismos de regulação do ciclo celular encontram-se frequentemente mutadas durante a progressão dos tumores. A super-expressão de CDKs e ciclinas, a perda da função das CKIs e da expressão de pRB ou p53 são normalmente reportados em diferentes neoplasias. As modificações são resultado de alterações cromossômicas tais como amplificação e translocação de oncogenes e deleção de proteínas supressoras de tumor (COLLINS *et al.*, 1997; DIAZ-MORALLI *et al.*, 2013).

FIGURA 5 CICLO CELULAR



FONTE: O Autor (2017).

2.5.3 Morte celular

Atualmente, três mecanismos principais de morte celular são bem descritos na literatura: (1) apoptose, (2) necrose e (3) autofagia (NAVARRO; SALVESEN, 2016).

2.5.3.1 Apoptose

A morte celular por apoptose, ou morte celular programada, desenvolve um papel fisiológico essencial para a manutenção do desenvolvimento, homeostase e imunidade celular. Pode ser induzida por diversos fatores, como irradiação- γ , retirada de nutrientes, hipóxia ou ativação dos receptores de morte celular (GHOSH; ROTH, 2014; BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017; GORDEZIANI *et al.*, 2017; ZAMARAEV *et al.*, 2017). O processo apoptótico ocorre com mínima resposta inflamatória e imunológica, e sem destruição do tecido adjacente, devido à manutenção da membrana plasmática intacta durante todo o processo. Morfologicamente, as células em apoptose apresentam forma arredondada, redução

do volume celular, condensação da cromatina (picnose), retração de pseudópodes, fragmentação nuclear (cariorrhexis), rearranjo do citoesqueleto, perda de contato com a matriz extracelular, e formação de vesículas separadas por uma membrana (“blebs”), os quais são rapidamente reconhecidos por fagócitos (GHOSH; ROTH, 2014; BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017; GORDEZIANI *et al.*, 2017; ZAMARAEV *et al.*, 2017).

O evento central para o início da apoptose é exercido após ativação de enzimas proteolíticas do tipo cisteína proteinases (caspases). As caspases catalisam a decomposição de proteínas celulares através do reconhecimento específico de anéis tetrapeptídicos e quebra das suas ligações nos terminais carboxílicos de unidades de ácido aspártico. Por esta razão foram denominadas caspases: “c” de cisteína, “asp” de aspartato, e “ase” que provém da nomenclatura das enzimas. Nas células, as caspases são sintetizadas na forma de precursores inativos denominados pró-caspases, os quais são ativados somente após estímulo pró-apoptótico. As caspases são classificadas em iniciadoras e efetoras. As primeiras compreendem as caspases -2, -8, -9 e -10, que são ativadas mediante auto-catálise. As últimas compreendem as caspases -3, -6 e -7, são ativadas pelas caspases iniciadoras e tem a função de clivar múltiplos substratos celulares, levando à destruição da célula. Dois mecanismos podem desencadear a apoptose: (1) extrínseco e (2) intrínseco (FIGURA 6) (GHOSH; ROTH, 2014; BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017; GORDEZIANI *et al.*, 2017; ZAMARAEV *et al.*, 2017).

A via extrínseca resulta de um estímulo externo, como por exemplo a sinalização extracelular através de receptores da superfamília do fator de necrose tumoral TNF (receptores TNF- α , Fas-L ou TRAIL). Uma vez ativados, os receptores recrutam a proteína adaptadora FADD, que associa-se à pró-caspase 8 formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Este complexo é responsável pela ativação da caspase 8 e indução de uma cascata efetora que inclui as caspases 3, 6 e 7, levando à morte celular irreversível (YAACOUB *et al.*, 2016; BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017) (FIGURA 6).

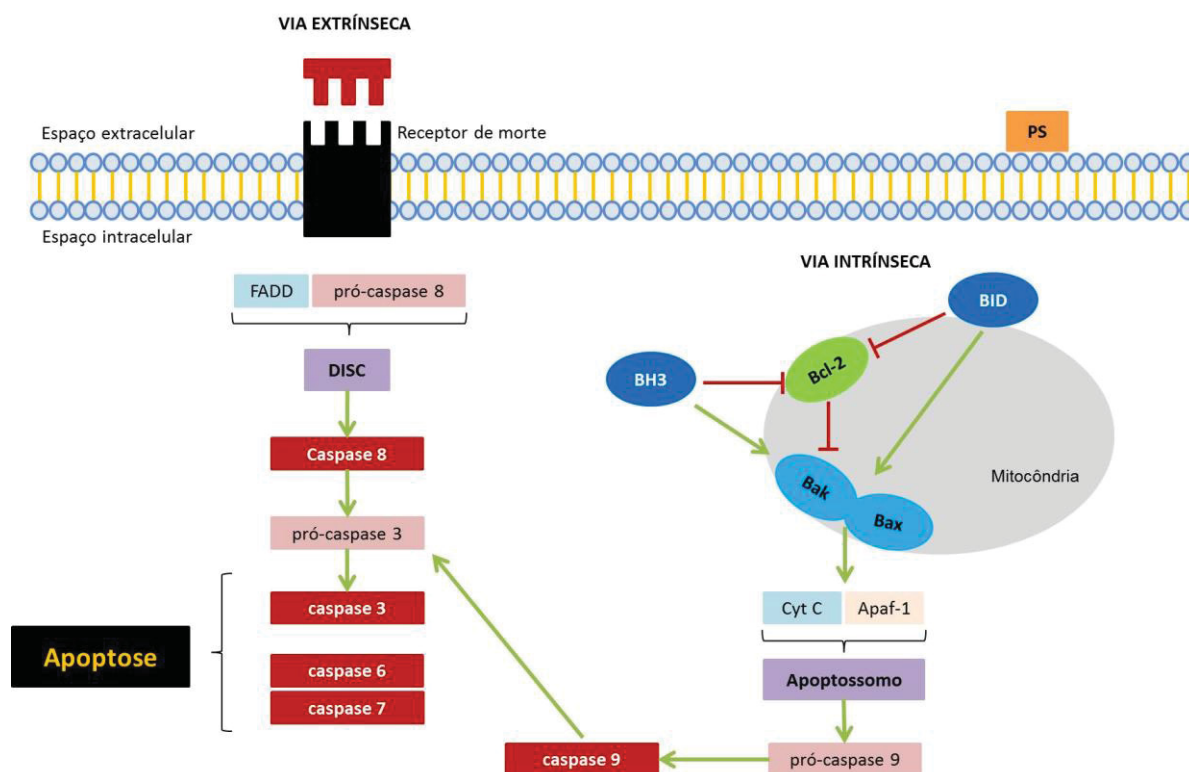
A via intrínseca, também referida como via mitocondrial ou induzida por estresse, resulta de estímulos internos tais como danos excessivos ao DNA ou estresse oxidativo. Esta via resulta na ruptura da membrana externa da mitocôndria, permitindo a liberação do citocromo c da membrana mitocondrial interna para o citoplasma, o qual liga-se ao fator de ativação de protease apoptótica Apaf1

formando o complexo denominado apoptossomo. Este ativa a caspase 9, que cliva a pró-caspase 3 em caspase 3, culminando com uma série de eventos que resulta na formação dos corpos apoptóticos. Adicionalmente, o fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS) é translocado da parte interna para a parte externa da membrana plasmática, permitindo que outras células tais como fagócitos reconheçam os corpos apoptóticos e os fagocitem (YAACOUUB *et al.*, 2016; BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017) (FIGURA 6). Vale destacar o importante papel das proteínas da família Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*) na regulação da apoptose intrínseca. A família Bcl-2 pode ser subdividida em 3 grupos de acordo com as suas funções no processo de apoptose:

- Proteínas anti-apoptóticas: incluem Bcl-2, Bcl-x, Bcl-w, MCL-1, BFL-1 e BCL-B, as quais atuam sequestrando proteínas pró-apoptóticas (BH3, Bak ou Bax), prevenindo a permeabilização da membrana mitocondrial externa e subsequente apoptose.
- Proteínas pró-apoptóticas BH3: incluem Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Noxa e Puma. Todas elas atuam através da interação com as proteínas anti-apoptóticas com objetivo de induzir a permeabilização da membrana mitocondrial externa e subsequente apoptose. Entretanto, somente os ativadores Bid, Bim e Puma podem ativar diretamente outras proteínas pró-apoptóticas, como Bak e Bax.
- Proteínas pró-apoptóticas efetoras: incluem Bax, Bak e Bok, cuja função é de fato permeabilizar a membrana mitocondrial externa. A atividade de Bax e Bak é regulada pela interação destas com as proteínas das famílias BH3 e Bcl-2 (GHOSH; ROTH, 2014; BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017).

A apoptose desenvolve um papel essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase. Entretanto, em condições patológicas como o cancer, as células perdem a capacidade de induzir a apoptose, super-expressando proteínas com função anti-apoptótica, indiretamente levando à proliferação celular descontrolada (MOHAMMAD *et al.*, 2015).

FIGURA 6 VIAS EXTRÍNSECA E INTRÍNSECA DA APOPTOSE



FONTE: O Autor (2017)

2.5.3.2 Necrose

A morte celular por necrose é morfologicamente caracterizada por ganho de volume celular, turgescência de organelas, ruptura da membrana plasmática e consequente perda do conteúdo intracelular, acompanhada de resposta inflamatória intensa. Pode ser induzida por estresses físicos ou químicos, tais como toxinas, radiação, temperatura, trauma, hipóxia causada por interrupção do fluxo sanguíneo, e outros eventos (MOHAMMAD *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2017).

Embora a necrose tenha sido considerada por muito tempo como um processo desregulado, na última década pesquisas mostram que ela também pode ser ativada de forma programada. Basicamente, pode ser ativada de forma semelhante à apoptose, mas morfologicamente exibe um padrão necrótico, e por esse motivo tem sido denominada de necroptose. (MOHAMMAD *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2017). A necroptose tem sido reconhecida como um modelo de morte celular associado a doenças como Alzheimer, Huntington, Gaucher, AVC, câncer,

hepatite aguda, hepatite crônica alcoólica ou não alcoólica, sepse, doenças da pele, inflamação no intestino, aterosclerose, infarto do miocárdio, além de infecções virais e bacterianas (ARORA *et al.*, 2017; CHICO *et al.*, 2017).

A necroptose pode ser iniciada por diversos fatores, incluindo membros da família de receptores de morte (Fas, TNFR-1, TRAILR, DR3, DR6), receptores Toll like (TLR3, TLR4, Fn14), receptores de célula T (TCRs), interferons, além de estresses celulares como radiação ionizante, espécies reativas do oxigênio e terapia fotodinâmica. Todos estes estímulos convergem para duas moléculas principais envolvidas na maquinaria da necroptose: RIPK3 (*receptor interacting serine-treonine protein kinase 3*) e MLKL (*mixed-lineage kinase domain-like protein*) (CHICO *et al.*, 2017).

À medida que vias de sinalização para necroptose tem sido estudadas, muitos dos eventos ainda são indistinguíveis. Por exemplo, como uma célula decide quais fatores determinarão entre o processo de necroptose ou apoptose ainda não é claro. Até o momento, sabe-se que a necroptose não é aparente em células com maquinaria apoptótica intacta, mas pode atuar como mecanismo suicida sob condições em que a apoptose clássica encontra-se desregulada, ou na presença de desordens inflamatórias. Fora isto, a apoptose é a via de morte celular de preferência das células, visto que já é um processo fisiologicamente conservado (ARORA *et al.*, 2017; CHICO *et al.*, 2017).

2.5.3.3 Autofagia

A autofagia é um processo de degradação intracelular conservado, que desenvolve um papel crítico em diversos processos celulares como desenvolvimento e diferenciação, adaptação celular a diferentes condições do microambiente, supressão tumoral e imunidade inata e adaptativa. Ocorre em níveis basais na maioria das células (GHOSH; ROTH, 2014; LALAOUI *et al.*, 2015).

Em resposta a estresses como privação de nutrientes ou tratamentos com agentes tóxicos, a célula inicia a resposta autofágica, na qual porções do citoplasma e organelas inteiras danificadas são sequestradas em vesículas denominadas autofagossomos, e enviadas aos lisossomos para degradação e reciclagem.

Morfologicamente, há perda da condensação da cromatina e acúmulo de numerosos vacúolos autofágicos no citoplasma da célula. Nesse caso, o processo autofágico tem como objetivo manter a homeostase intracelular e promover sua sobrevivência. Adicionalmente, pode prevenir danos causados por quimioterápicos, por manter o balanço intracelular através da remoção de organelas disfuncionais (GHOSH; ROTH, 2014; MOHAMMAD *et al.*, 2015).

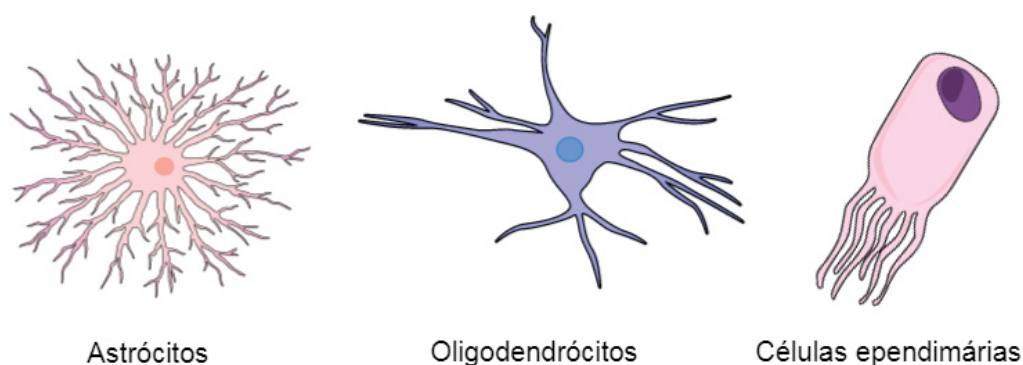
Entretanto, tem sido sugerido que esse mecanismo pode facilitar a quimioresistência e manter sobrevivência de células tumorais. De fato, após tratamento com quimioterápicos indutores de apoptose, a autofagia é observada em células tumorais, atuando como um mecanismo de proteção que garante a sobrevivência das células tumorais (GHOSH; ROTH, 2014; MOHAMMAD *et al.*, 2015).

Alternativamente, o processo autofágico pode levar à morte celular, sendo denominado de “morte celular programada tipo II”. Em muitos casos, as vias envolvidas na apoptose e na autofagia são reguladas por fatores comuns, os quais podem ativar ou inibir as duas vias simultaneamente. Adicionalmente, células que apresentam algum dano na sinalização apoptótica, como inibição da caspase 8, podem induzir a morte celular por autofagia através da ativação da via de morte do gene de ativação relacionado à autofagia Atg6 e Atg7 (LALAOUI *et al.*, 2015; MOHAMMAD *et al.*, 2015).

2.6 TUMORES CEREBRAIS - GLIOMAS

Os gliomas são tumores originados no sistema nervoso central, a partir das células da glia. Estas células compreendem os astrócitos, os oligodendrócitos e as células ependimárias (FIGURA 7). Cada um deles pode originar os astrocitomas, os oligodendrogliomas e os ependimomas, respectivamente. Além disso, é possível ter tumores mistos, como os oligoastrocitomas (RAO, 2003; ABTA, 2017).

FIGURA 7 CÉLULAS DA GLIA



FONTE: O Autor (2017).

Os oligodendrócitos cercam os axônios de cada neurônio com a bainha de mielina, aumentando a eficiência de condução dos impulsos elétricos ao longo dos neurônios. As células endodimárias localizam-se entre os espaços ventriculares do cérebro e do canal da medula espinhal, e tem função de regular a difusão de líquido cefalorraquidiano nas regiões paraventriculares do cérebro. Os astrócitos apresentam extensões de membrana que se comunicam com a membrana basal de células endoteliais para formar a barreira hemato-encefálica, e também tem função de nutrir os neurônios ao seu redor e o ambiente extracelular. Além disto, atuam na sinalização envolvida nos circuitos sinápticos. Estas células são as mais numerosas de todas as células da glia, e originam os astrocitomas (RAO, 2003; ALLEN; EROGLU, 2017).

De acordo com características histopatológicas e o prognóstico, a Organização Mundial da Saúde distingue quatro graus de malignidade para os astrocitomas (I, II, III e IV) (RAO, 2003; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; ABTA, 2017):

- Astrocitoma de grau I: é benigno e normalmente está associado a maior sobrevida. Cresce lentamente e as células são bem diferenciadas. Compreendem cistos denominados de astrocitoma pilocítico, e ocorrem com mais frequência em crianças. O tratamento cirúrgico é efetivo para tumores deste grau (RAO, 2003; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; ABTA, 2017);
- Astrocitoma de grau II: também apresenta crescimento lento, entretanto, é capaz de se espalhar para tecidos normais, e pode evoluir

para graus maiores. Os astrócitos apresentam atipia nuclear e pleomorfismo difuso (RAO, 2003; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; ABTA, 2017);

- Astrocitoma de grau III: ou astrocitoma anaplásico, é morfologicamente semelhante aos tumores de grau II, entretanto é caracterizado pelo aumento da densidade celular, alta porcentagem de proliferação celular e mitose, e capacidade de migração para tecidos cerebrais normais. Normalmente tendem a recorrer como tumores de maior grau (RAO, 2003; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; ABTA, 2017);
- Astrocitoma de grau IV: também denominado glioblastoma, é o mais agressivo dos gliomas e o mais frequente (50%). Apresentam células com padrão morfológico irregular, crescimento descontrolado, rápida proliferação do endotélio vascular, infiltração para tecidos cerebrais normais. Consistente com a morte celular dos astrócitos (áreas de necrose) vale ressaltar que a função dos mesmos em sustentar a barreira hematoencefálica encontra-se corrompida (RAO, 2003; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; ABTA, 2017).

Os tumores de baixo grau ocorrem com mais frequência em jovens (20 a 40 anos), e os gliomas de grau III e IV tem pico de incidência em idosos (50 a 84 anos). Estes representam aproximadamente 76% de todos os gliomas. O prognóstico é ruim, com média de sobrevida de aproximadamente 15 meses, sendo que apenas 3 a 5% dos pacientes sobrevive até 5 anos após o diagnóstico (WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; JURATLI *et al.*, 2013; STURM *et al.*, 2014). O prognóstico dos tumores do sistema nervoso central é pobre, mesmo após o diagnóstico. A taxa média de sobrevida varia de 17 semanas sem tratamento a 30 semanas com tratamento (RAO, 2003). No mundo, cerca de 2% de todos os tumores malignos são representados pelos tumores do sistema nervoso central (INCA, 2016). No Brasil, foram estimados 5440 novos casos em homens e 4830 em mulheres para o ano de 2016, segundo dados do INCA (2016).

O tratamento de escolha para pacientes com glioblastoma é a remoção cirúrgica do tumor, seguido de radioterapia e quimioterapia. Entretanto, a remoção cirúrgica é pouco eficaz devido à sua natureza invasiva, o que normalmente leva a recorrência com lesões de maior grau. O tratamento com o quimioterápico temozolomida pode aumentar a sobrevida, porém tem demonstrado sucesso

limitado, devido à resistência das células ao tratamento. O bevacizumab é um anticorpo monoclonal que atua diretamente contra o fator de crescimento do endotélio vascular VEGF-A, que também tem sido utilizado como terapia contra o glioblastoma (RAO, 2003; KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011; BLOCH *et al.*, 2013; JURATLI *et al.*, 2013; WANG; JIANG, 2013; STURM *et al.*, 2014).

A eficácia dos agentes quimioterápicos é baixa devido às diversas alterações genéticas das células tumorais, que se manifestam através da desregulação de vias de sinalização envolvidas no crescimento, proliferação, sobrevivência e apoptose celular. As células tumorais podem evitar a apoptose, e com isto perturbar a homeostase entre apoptose e proliferação (SAGGIORO *et al.*, 2014). Muito é conhecido sobre a diversidade de genótipos envolvidos nos fenótipos histológicos heterogêneos do glioblastoma e como eles impactam a sinalização para sobrevivência celular, entretanto não há ainda terapias consolidadas (KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010).

As alterações nos níveis de expressão gênica e/ou proteínas mais observadas nos glioblastomas incluem amplificação dos genes EGFR (*epidermal growth factor receptor*), identificada em até 40% dos pacientes, PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), PI3KR1 (*phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha*), IDH1 (*isocitrate dehydrogenase 1*) e o gene PTEN (*phosphatase and tensin homologue*), que encontra-se mutado em 36% dos glioblastomas. Mutações em EGFR, PDGFR, PI3K e PTEN levam à ativação de Akt, que estimula a via mTORC-1, responsável pelo estímulo do metabolismo de proteínas e lipídios, essenciais para a proliferação celular (EISELE; WELLER, 2013; TANAKA *et al.*, 2013; VEHLOW; CORDES, 2013; COLQUHOUN, 2017).

Além disso, mutações em p53 aparecem em cerca de 28% dos glioblastomas, e causam perda da função dessa proteína, implicando no aumento do fluxo glicolítico, proliferação celular descontrolada e resistência à apoptose. A hipóxia normalmente observada em gliomas leva à ativação e estabilização de HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) e HIF-2 α (*hypoxia-inducible factor 2 α*), os quais estimulam ainda mais o metabolismo glicolítico e a angiogênese. Adicionalmente, algumas vias de sinalização pró-angiogênicas contribuem para a proliferação vascular ao redor do tumor, uma das principais características dos glioblastomas. O fator de crescimento VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e seu receptor

VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) tem papel chave neste processo, assim como bFGF (*basic fibroblast growth factor*) e o HGF (*hepatocyte growth factor*). A ativação dessas vias nas células tumorais resulta na ativação da cascata de sinalização por PI3K/Ras/MAPK, culminando com a proliferação de células endoteliais e propiciando a migração das células tumorais (EISELE; WELLER, 2013; TANAKA *et al.*, 2013; VEHLLOW; CORDES, 2013; COLQUHOUN, 2017).

2.7 TUMORES DE PELE - MELANOMA

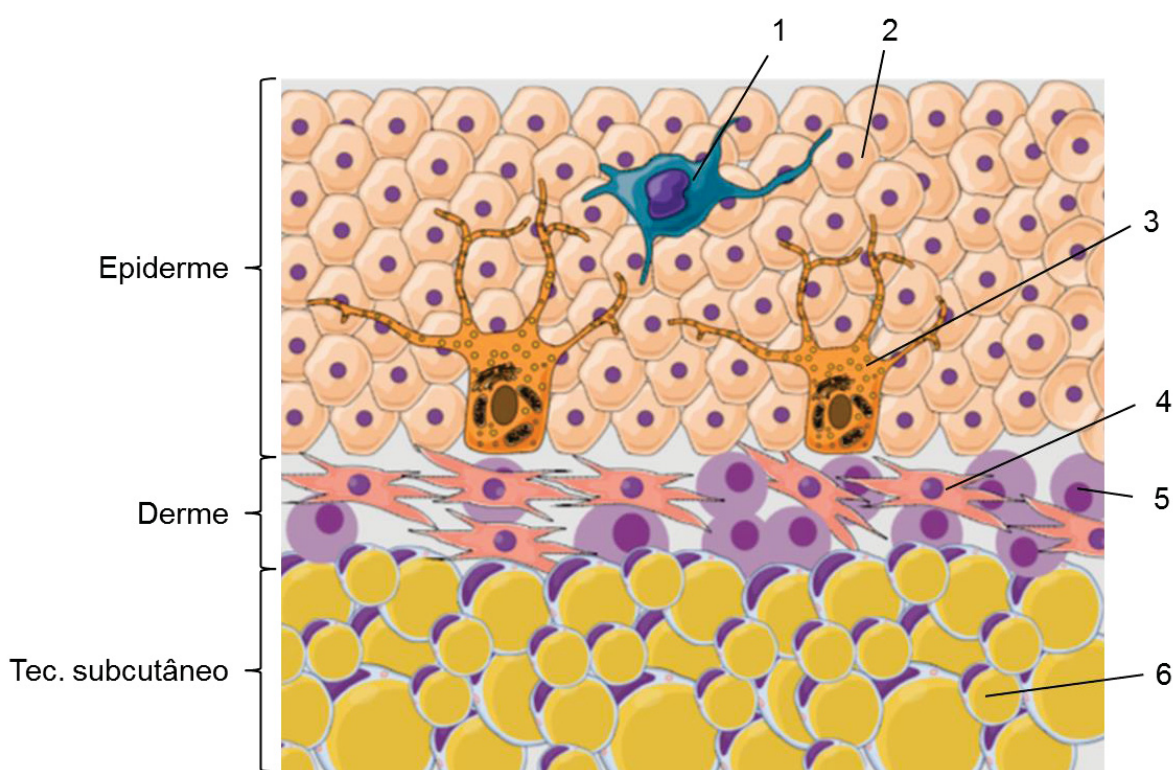
A pele, principal proteção contra agressões ambientais, é composta por 3 camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo (FIGURA 8). A epiderme é a camada externa que entra em contato com o ambiente e tem função de barreira físico-química contra estresses ambientais como patógenos, agentes químicos e radiação ultravioleta. As principais células epidérmicas compreendem os queratinócitos, as células de Langerhans e os melanócitos. A derme dá suporte às estruturas cutâneas, tais como folículos capilares, nervos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, além de conter diversas células imunes e fibroblastos, que participam nas respostas fisiológicas da pele (LANG *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.*, 2015).

Os melanócitos são células dendríticas derivadas da crista neural, encontradas na membrana basal da epiderme, nos olhos, meninges, ossos e coração. Durante o desenvolvimento embrionário, os melanoblastos diferenciam-se em melanócitos, os quais contêm uma organela denominada melanossomo, responsável pela produção do pigmento melanina. A melanina dá cor à pele e minimiza danos teciduais oriundos da exposição à radiação ultravioleta (UV) (LANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; NIKITOVIC *et al.*, 2014; PALUNCIC *et al.*, 2016).

A transformação maligna dos melanócitos é um processo que envolve 5 etapas. Primeiramente há a formação de um nevo benigno na epiderme, resultado de um aumento da proliferação dos melanócitos (estágio 0, ou melanoma *in situ*). Na sequência, alguns destes melanócitos apresentam displasia, causando lesões intra-epidérmicas, e as células começam a proliferar-se em sentido horizontal pela

epiderme, caracterizando uma invasão local (estágio 1, ou fase de crescimento radial). Posteriormente, as células tumorais invadem a derme e o tecido subcutâneo (estágio II ou fase de crescimento vertical), eventualmente chegando ao endotélio capilar, o que está associado com o aumento do risco de desenvolver metástase. Ao atingir o estágio III, as células atingem os linfonodos, e no estágio IV metástases podem ser detectadas, comumente em outras regiões da pele, nos pulmões, fígado ou cérebro (NIKITOVIC *et al.*, 2014; PALUNCIC *et al.*, 2016; PITCOVSKI *et al.*, 2017).

FIGURA 8 CAMADAS DA PELE



FONTE: O Autor (2017).

Nota: 1 = Células de Langerhans. 2 = Queratinócitos. 3 = Melanócitos. 4 = Fibroblastos. 5 = Células imunes. 6 = Adipócitos.

No Brasil, o melanoma tem predominância em adultos brancos, e representa apenas 3% das neoplasias malignas da pele, entretanto, é um tumor altamente metastático e letal. Estimativas do INCA para 2016 apontaram 5670 novos casos, sendo 3000 em homens e 2670 em mulheres (INCA, 2016). Estudos epidemiológicos sugerem que os principais fatores de risco são: o histórico familiar, a presença de nevos benignos ou atípicos, sensibilidade e nível de exposição à

radiação UV. O tratamento de escolha depende do estágio da doença. A excisão cirúrgica é escolhida em fases iniciais (estágios 0, 1 e 2), enquanto pacientes em estágios mais avançados mostram resistência às terapias convencionais (radio e quimioterapia), devido ao alto potencial de invasão e metástase do tumor, sendo essas as principais causas do prognóstico ruim. Progressos têm sido feitos com imunoterapia ou terapia direcionada, entretanto ainda estão longe de serem eficazes (LIU *et al.*, 2014; NIKITOVIC *et al.*, 2014; ABILDGAARD; GULDBERG, 2015; SIMÕES *et al.*, 2015).

Avanços no estudo das vias de sinalização e das alterações moleculares possibilitam o desenvolvimento de novas terapias específicas para interferir na formação e progressão do melanoma, incluindo o controle do ciclo celular, a sobrevivência celular, a angiogênese e o metabolismo tumoral. O início e progressão do melanoma têm sido associados com mutações em diferentes genes, sendo a mais comum na proteína quinase BRAF. Mutações no gene Raf são observadas em aproximadamente 15 a 20% dos tumores do tipo melanoma. Estas alterações causam ativação contínua das vias de sinalização ERK/MAPK (*extracellular signal-regulated kinase / mitogen-activated protein kinase*), as quais participam da regulação do crescimento celular, sobrevivência e angiogênese. Adicionalmente, mutações em N-Ras estimulam a via PI3K/Akt, envolvidas na resistência à apoptose, aumento da proliferação celular e quimioresistência. De forma semelhante, são frequentes (aproximadamente 20%) as mutações que inativam o gene PTEN, envolvido na inibição da sinalização da via PI3K, e a super-expressão de Akt (mais que 60%), o qual inibe a apoptose em células de melanoma, aumentando a sobrevivência. Adicionalmente as ciclinas D e as CDKs 4, 6 e 2, que são mediadoras chave da progressão do ciclo celular, encontram-se super-expressas, e os inibidores de CDK p16^{INK4} e p14^{ARF} encontram-se inativos (WAGNER; FISHER, 2005; CARLSON *et al.*, 2007; NIKITOVIC *et al.*, 2014).

2.8 ATIVIDADE ANTITUMORAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS VERDES

O prognóstico do glioblastoma e do melanoma, aliado à resistência destas células aos tratamentos de escolha atualmente disponíveis torna indispensável o desenvolvimento de novos tratamentos, com o objetivo de reduzir os efeitos adversos da radioterapia e quimioterapia, melhorar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes. Os polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas constituem uma alternativa promissora, embora para as algas verdes ainda são poucos os estudos que abordam atividade antitumoral. Dentre os polissacarídeos sulfatados de algas verdes, as ulvanas são as mais estudadas, tanto no aspecto estrutural como de atividade biológica.

Um estudo realizado por Thanh *et al* (2016) mostrou que as ulvanas obtidas de *Ulva lactuca* (18,9% de sulfato e 21,5% de ácidos urônicos) são citotóxicas para as linhagens tumorais de hepatocarcinoma (HepG2), câncer de mama (MCF-7) e câncer cervical (HeLa). A redução da viabilidade foi máxima na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e os valores de IC_{50} foram calculados em 29,67; 25,09 e 35,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para cada linhagem, respectivamente. Vale ressaltar que as ulvanas extraídas de *Ulva lactuca*, em concentrações variando entre 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1,5 mg.mL^{-1} , não são citotóxicas para células normais de fibroblasto murino (linhagem L929), como demonstrado por Alves *et al* (2012).

Recentemente, Ellatef *et al* (2017) descreveram o efeito antitumoral da ulvana extraída de *Ulva lactuca* em câncer de mama. Ratas Wistar foram tratadas com uma dose única (25 mg.kg^{-1}) de DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno), um hidrocarboneto aromático policíclico e carcinogênico frequentemente utilizado como composto modelo para câncer de mama em roedores, e na sequência foram tratadas com as soluções de polissacarídeo (50 mg.kg^{-1}). Após 10 dias, foram realizadas análises histopatológicas, imunohistoquímicas e bioquímicas. Os animais tratados com ulvana não mostraram alterações histopatológicas quando comparados com os animais controle. A proteína supressora de tumor p53 foi suprimida e a proteína anti-apoptótica Bcl-2 foi altamente expressa nos animais controle, enquanto nos animais tratados com ulvana houve níveis de expressão aumentados de p53 e diminuídos de Bcl-2. Além disso, as ulvanas foram capazes de diminuir os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ e NO

em 33,95% e 36,86%, respectivamente, da peroxidação lipídica (51,28%), e aumento das atividades das enzimas glutathione redutase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase e catalase (35,90; 209,30; 121,1 e 334,64%, respectivamente), quando comparadas aos controles. Testes *in vitro* com a linhagem de carcinoma humano MCF-7 sugerem que as ulvanas (25 a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) diminuem a viabilidade celular desta linhagem (ELLATEF *et al.*, 2017).

Ainda, outra ulvana extraída de *Ulva lactuca* foi capaz de aumentar em $\sim 83\%$ a sobrevivência de ratas portadoras de adenocarcinoma de mama, causando depleção do número de células viáveis, além de diminuir a expressão de Bcl-2, aumentar a expressão de p53 e diminuir os níveis plasmáticos de ácido siálico (em $\sim 32\%$). *In vitro*, a viabilidade de células de adenocarcinoma de mama (EAC) foi inibida em 65% (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), enquanto os valores de IC_{50} para hepatocarcinoma (HepG2) e carcinoma de cólon (HCT116) foram de ~ 55 e ~ 23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (AHMED; AHMED, 2014).

Outro tipo estrutural de polissacarídeos de algas verdes, as ramnanas sulfatadas nativas e purificadas obtidas de *Monostroma nitidum*, na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram citotóxicas contra células de carcinoma gástrico humano (AGS) e cervical (HeLa) em 35 a 75,4% e 40%, respectivamente. Para avaliar a atividade imunomodulatória, células de macrófago murino (linhagem Raw 264.7) foram expostas a tais polissacarídeos e avaliadas quanto à liberação de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E_2 (PGE_2). Os polissacarídeos nativos e purificados não apresentaram citotoxicidade contra os macrófagos, e foram capazes de induzir a liberação de NO em até ~ 52 μM , na maior concentração testada (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), através do estímulo da expressão da enzima iNOS (óxido nítrico sintase). Os níveis de PGE_2 variaram de 0,1 a 11,1 ng.mL^{-1} em concentrações de 0,5 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeos. Macrófagos ativados liberam fatores celulares como o NO, o $\text{TNF-}\alpha$ e a PGE_2 que tem como objetivo inibir o crescimento de células tumorais, através do aumento da resposta imunológica. Os polissacarídeos testados apresentam teores de sulfato variando entre 1,8 e 17,7%, e de ácidos urônicos entre 13,3 e 21,8%, e apresentam majoritariamente ramnose e glucose como monossacarídeos neutros, entretanto, não foi estabelecida uma correlação entre a estrutura química e a atividade biológica (KARNJANAPRATUM; YOU, 2011).

No nosso grupo de pesquisa, foi investigado, *in vitro*, o potencial antitumoral de heteroramnanas sulfatadas com diferentes características estruturais, obtidas de

Gayralia oxysperma, contra linhagem de glioblastoma humano (U87MG) (ROPELLATO *et al.*, 2015). Após despolimerização parcial por degradação controlada de Smith, foram obtidas duas frações homogêneas denominadas OX-6Sb ($1,093 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$) e OX-6Sc ($2,511 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$), com alto teor de sulfato (33,5 e 41%, respectivamente). Análises de metilação mostraram que as frações são constituídas majoritariamente por unidades de ramnose 3- e 2-ligadas, monossulfatadas, dissulfatadas ou não sulfatadas em uma proporção de 1:0,18:0,45 para a fração OX-6Sb e 1:0,47:0,32 para a fração OX-6Sc, mostrando que além da diferença do tamanho, existem diferentes padrões de sulfatação para cada polissacarídeo. A viabilidade das células U87MG expostas aos polissacarídeos foi reduzida de forma concentração-dependente (10 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo que a fração OX-6Sb apresentou menor efeito citotóxico. No tempo de 48 horas as frações OX-6Sb e OX-6Sc reduziram 26,6 e 28% da viabilidade celular (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente. OX-6Sb não apresentou alterações no ciclo celular nestas condições, entretanto, a fração OXSc promoveu aumento significativo das células na fase G₁ e diminuição de células nas fases S e G₂. Não foi observada a presença de DNA fragmentado após tratamento com nenhum destes polissacarídeos. A expressão dos marcadores do ciclo celular p21 e p53 foi significativamente aumentada após exposição à fração OX-6Sc. Os resultados sugerem que a diminuição da massa molecular e a menor proporção de unidades de ramnose dissulfatadas contribuem para a diminuição da atividade antitumoral, mesmo com teor de grupos sulfato semelhantes (OX-6Sb, $1,09 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ e 33,5% de sulfato; e OX-6Sc, $2,511 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ e 41% de sulfato). A partir dos resultados obtidos foi possível determinar que a presença de unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-3 e C-4 (3,2 vezes maior para OX-6Sc) foi um dos fatores que diferenciou a atividade e potencial destes fragmentos (DE CARVALHO, 2013; ROPELLATO *et al.*, 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 POSICIONAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Gayralia brasiliensis*

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridiplantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulotrichales

Família: Gayraliaceae

Gênero: *Gayralia*

Espécie:

***Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C.Oliveira & N.S.Yokoya**

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO DA MACROALGA *Gayralia brasiliensis*

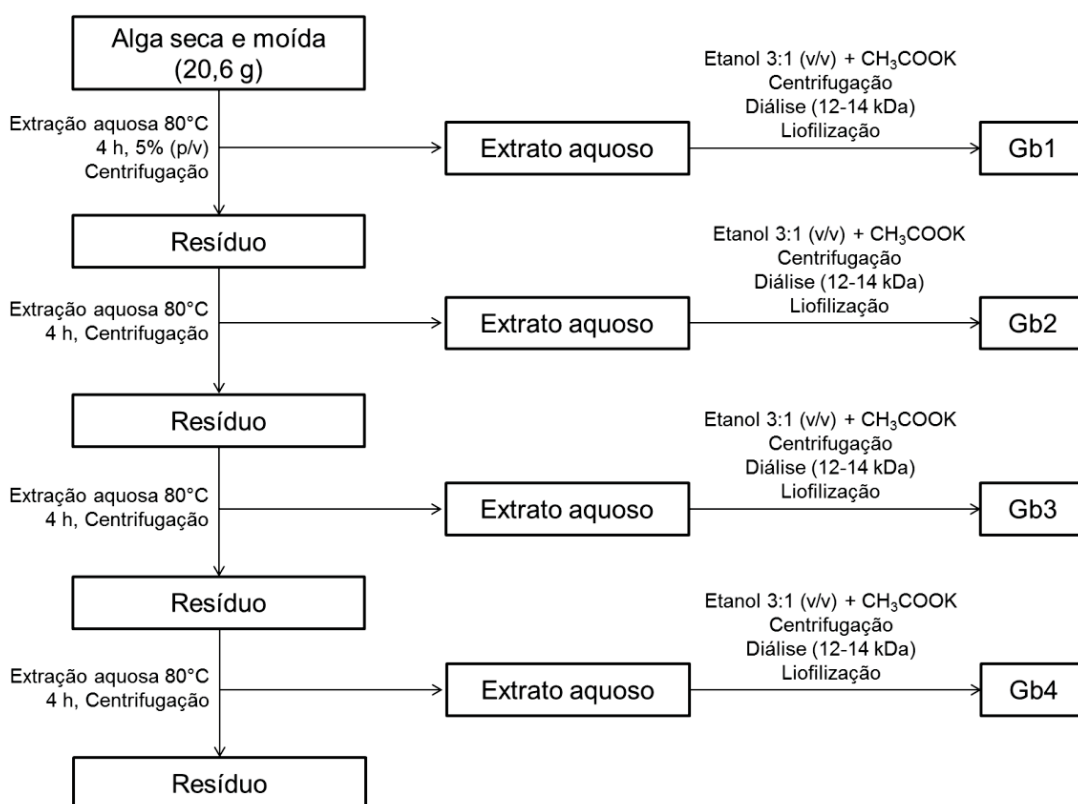
Amostras da alga verde *Gayralia brasiliensis* foram coletadas na Baía de Guaratuba (Guaratuba-PR) no mês de setembro de 2013, e identificadas pela Prof^a Dr^a Franciane M. Pellizzari, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá (PELLIZZARI *et al.*, 2013). Os exemplares da alga foram lavados com água doce, parcialmente secos em estufa (35 a 40°C), liofilizados, e moídos em moinho (IKA[®] A11 basic).

3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. brasiliensis*

Os exemplares de *G. brasiliensis* (20,6 g) secos e moídos foram submetidos a 4 extrações aquosas sequenciais em temperatura de 80°C, concentração 5% (p/v), sob agitação mecânica, por 4 h (BERTÉ, 2013). Após cada etapa, os extratos foram centrifugados (8000 rpm, 20 min, 5°C) e cada extrato foi tratado com etanol (3:1 v/v) e acetato de potássio (CH₃COOK) para precipitação dos polissacarídeos. Estes foram separados por centrifugação, ressolubilizados em água destilada e

submetidos a diálise sequencial (membrana *cut off* de 12 a 14 kDa) contra água destilada, contra NaCl para remoção do CH_3COOK , e novamente contra água destilada. Em seguida, o material dialisado contendo polissacarídeos foi submetido a redução do volume em rota-evaporador e liofilizado, gerando as frações polissacarídicas Gb1, Gb2, Gb3 e Gb4, nomeadas segundo a ordem de extração. A biomassa residual das extrações foi liofilizada e armazenada em freezer a -20°C . Um esquema do procedimento de extração pode ser visualizado na FIGURA 9.

FIGURA 9 FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. brasiliensis*



3.4 PURIFICAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA

A fração bruta Gb1 foi submetida à ultrafiltração em membrana de polietersulfona com limite de exclusão de 300 kDa (Millipore), em sistema de filtração modelo 16429 (SARTORIUS) acoplado a cilindro de ar comprimido.

Para isto, o polissacarídeo foi solubilizado em água destilada na concentração de 0,1 g%, e submetido à filtração sob pressão. O material retido na membrana foi ressolubilizado em água e novamente ultrafiltrado. Este processo foi repetido mais

uma vez, gerando a fração retida denominada Gb1r e três frações eluídas que foram reunidas gerando a fração denominada Gb1e.

3.5 PERSULFATAÇÃO QUÍMICA DA HETERORAMNANA SULFATADA Gb1

A persulfatação da fração Gb1 foi realizada de acordo com Araújo *et al* (2013). Inicialmente, o polissacarídeo foi solubilizado em água destilada, reduzido com NaBH₄ durante 6 h, neutralizado, dialisado (*cut off* 12-14 kDa) sequencialmente contra solução de trietilamina 3% e água destilada, e liofilizado. Este processo é realizado para obter o correspondente polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio e melhorar a sua solubilidade no solvente dimetilformamida anidro (DMFa). A amostra seca (1 g) foi solubilizada em 100 mL de DMF anidra. Lentamente e sob agitação magnética, foram adicionados 10 g de complexo trióxido de enxofre piridina (SO₃–Py), juntamente com 20 mL de 2-metil-2-buten-1-ol (2M2B). O pH do meio reacional foi mantido em 4,5, e após 7 h de reação, esta foi interrompida com banho de gelo e neutralizada com bicarbonato de sódio 1 M. O polissacarídeo foi recuperado do meio reacional através da adição de etanol (3:1 v/v). Após centrifugação, o precipitado foi ressolubilizado em tampão fosfato 0,025 M, dialisado (*cut off* 12-14 kDa) contra NaCl 1 M por 24 h e em seguida contra água destilada, e liofilizado. A identificação da fração persulfatada se deu pela adição da letra “OS” (oversulfatada) ao final do nome original da mesma.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.6.1 Dosagem de carboidratos totais

A dosagem de carboidratos totais foi realizada pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando padrão de ramnose na concentração inicial 1 mg.mL⁻¹, a partir do qual foram realizadas diluições para realização da curva de

calibração, respeitando o limite de linearidade do método (10–40 µg de ramnose). A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 480 nm.

3.6.2 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Lowry *et al* (1951), utilizando padrão de albumina soro bovina (BSA) na concentração inicial de 1 mg.mL⁻¹, a partir da qual foram realizadas diluições para realização da curva de calibração, respeitando o limite de linearidade do método (5–100 µg). A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 660 nm.

3.6.3 Teor de grupos sulfato

O teor de grupos sulfato foi determinado através do método descrito por Dodgson e Price (1962), ou método turbidimétrico da gelatina-BaCl₂. Os polissacarídeos (entre 2 a 4 mg) foram submetidos à hidrólise ácida total em HCl 1 M, por 5 h, em temperatura de 105-110°C, permitindo a liberação dos grupos sulfato em solução. Ao entrar em contato com o complexo gelatina-BaCl₂, há formação do sal insolúvel BaSO₄, que mantém-se suspenso na gelatina, resultando em turbidez. O padrão utilizado para realização da curva de calibração foi uma solução de Na₂SO₄ na concentração de 1 mg.mL⁻¹, respeitando a linearidade de 2–200 µg de sulfato. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 360 nm.

3.6.4 Teor de ácidos urônicos

O teor de ácidos urônicos foi determinado pelo método da *m*-hidroxibifenila (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991). Como padrão para realização da curva de calibração foi utilizado o ácido glucurônico na concentração 100 µg.mL⁻¹, respeitando a linearidade de 1 – 38 µg de ácido glucurônico. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 525 nm.

3.6.5 Determinação da rotação óptica

A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{20}$) foi realizada em polarímetro Rudolph Research, modelo Autopol III, em temperatura de 20°C e comprimento de onda de 589 nm, utilizando cubetas de 10 cm de comprimento. As amostras foram solubilizadas em água destilada na concentração de 0,2% (m/v).

3.7 MÉTODOS QUÍMICOS DE ANÁLISE

3.7.1 Hidrólise ácida total, redução e acetilação

Para determinação da composição monossacarídica, as frações foram submetidas à hidrólise ácida total. Aproximadamente 1 mg de cada amostra foi solubilizada em 0,5 mL de TFA 1 M, e mantida em estufa a 100°C por 4 h. Após hidrólise, o TFA foi evaporado totalmente em atmosfera de ar comprimido, os monossacarídeos resultantes foram ressolubilizados em água destilada e reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4 ou NaBD_4), por 15 h em temperatura ambiente. Após neutralização com ácido acético diluído, o material foi seco em atmosfera de ar comprimido, e submetido à co-distilação com metanol (3 vezes), a fim de remover o ácido bórico formado durante a neutralização na forma de borato de metila (volátil). Em seguida, as amostras secas foram acetiladas com 0,5 mL de anidrido acético, por 1 h a 120°C e os acetatos de alditóis produzidos nesta etapa foram analisados por CG-EM.

3.7.2 Carboxirredução

Para a determinação da composição monossacarídica incluindo os ácidos urônicos, foi realizado o processo de carboxirredução, de acordo com os métodos de Taylor e Conrad (1972) e Anderson e Stone (1985). Através deste método os ácidos urônicos presentes no polímero são tratados com carbodiimida [1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida] (CMC), podendo, desta forma, ser reduzidos (com

NaBH₄ ou NaBD₄) a seu respectivo açúcar neutro.

As frações foram inicialmente solubilizadas em tampão MES 0,2 M (pH 4,75). Em seguida foi adicionada a carbodiimida (CMC), vagarosamente, na proporção de 1 mM de carbodiimida:100 µEq de carboxila. Após agitação por 1 h, o pH foi ajustado para 7 pela adição de tampão TRIS 2 M, e NaBH₄ (ou NaBD₄) foi adicionado vagarosamente até a obtenção de uma solução 2 M. Após 12 h a 30°C, a solução foi neutralizada com ácido acético (1:1 v/v), dialisada contra água destilada (*cut off* 6–8 kDa) e liofilizada.

As frações submetidas à carboxirredução e as massas utilizadas foram:

- Gb1: 1 g (com NaBH₄) e 35 mg (com NaBD₄);
- Gb1-OS: 400 mg (com NaBH₄) e 20 mg (com NaBD₄);
- Gb1r: 33,5 mg (com NaBH₄) e 6 mg (com NaBD₄).

A identificação das frações geradas pelo processo de carboxirredução foi realizada pela adição da letra “R” (carboxirreduzido) aos nomes originais das mesmas.

3.7.3 Dessulfatação por tratamento solvolítico

3.7.3.1 Preparo do sal de piridônio

A dessulfatação das frações foi realizada com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio. Para isto, as frações polissacarídicas foram solubilizadas em água destilada (30 mg.mL⁻¹), e posteriormente adicionadas à resina catiônica Dowex 50 x 8 na forma protonada (H⁺), sendo mantidas sob agitação por 30 min, até atingir pH 1-2. Cada material foi filtrado sob pressão reduzida, o sobrenadante foi neutralizado com piridina, e liofilizado (NAGASAWA *et al.*, 1979).

As amostras e massas utilizadas para o preparo do sal de piridônio foram:

- Gb1-R: 200 mg
- Gb1r-R: 16 mg

3.7.3.2 Solvólise

Os polissacarídeos na forma de sal de piridônio foram submetidos ao processo de dessulfatação solvolítica. Para este processo, os polissacarídeos foram solubilizados em uma mistura de dimetilsulfóxido:metanol:piridina (proporção de 89:10:1, v/v/v), respeitando a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL da mistura (NAGASAWA *et al.*, 1979). As soluções foram mantidas a 100°C em estufa, por 7 h. Após resfriamento, as amostras foram dialisadas contra água destilada (*cut off* 6–8 kDa) e liofilizadas. As frações dessulfatadas foram identificadas pela adição da letra “D” (dessulfatado) aos nomes originais das mesmas, e analisadas quanto à sua composição monossacarídica (item 3.6.1) e teor de grupos sulfato (item 3.5.3).

3.7.4 Metilação

3.7.4.1 Preparo do sal de trietilamônio

A metilação das frações carboxirreduzidas (Gb1-R, Gb1r-R e Gb1-OS-R) e carboxirreduzidas e dessulfatadas (Gb1-RD e Gb1r-RD) foi realizada com os polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio, a fim de facilitar a solubilização dos mesmos no solvente aprótico dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado no processo de metilação (STEVENSON; FURNEAUX, 1991). Para isto, as frações foram solubilizadas em água, reduzidas com NaBH₄ e neutralizadas com ácido acético diluído (1:1 v/v). Posteriormente, foram submetidas à diálise (*cut off* 6–8 kDa) contra água destilada e solução de trietilamina 3%, e liofilizadas.

3.7.4.2 Metilação e derivatização

A metilação dos polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio foi realizada de acordo com o método de Ciucanu e Kerek (1984). Cada fração foi solubilizada em DMSO na proporção de 1 mL a cada 15 mg de polissacarídeo, e a ela foi adicionado NaOH em pó (30 mg), mantendo a mistura sob agitação vigorosa durante 30 minutos. Na sequência, iodeto de metila (CH₃I) foi adicionado na proporção de 0,1 mL a cada 15 mg de polissacarídeo, e mantido sob agitação vigorosa por 30 min.

O processo de adição de NaOH e CH₃I foi repetido por mais duas vezes. A reação foi interrompida pela adição de água, e cada amostra foi neutralizada com ácido acético diluído, dialisada contra água destilada (*cut off* 12–14 kDa) e liofilizada, completando um ciclo de metilação. Todas as frações foram submetidas a este processo por pelo menos 2 vezes, a fim de garantir o máximo grau de metilação das amostras.

Após cada ciclo de metilação, as frações foram submetidas à hidrólise ácida total com ácido fórmico 45%, a 100°C por 16 h, redução com NaBH₄ (ou NaBD₄) e acetilação com anidrido acético por 1 h a 120°C. Após derivatização, os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por CG-EM.

3.7.4.3 Trideuteriometilação

As frações Gb1-R e Gb1r-R, previamente permetiladas usando CH₃I, de acordo com o item 3.7.4.2, foram submetidas sequencialmente aos processos de dessulfatação solvolítica e metilação utilizando iodometano trideuterado (CD₃I). Após hidrólise, redução e acetilação, os acetatos de alditóis parcialmente metilados e/ou trideuterometilados foram analisados por CG-EM.

3.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS, ESPECTROMÉTRICOS E ESPECTROSCÓPICOS

3.8.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

O método foi realizado em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massa da marca SATURN 200R, modelo ITD 800. Este é equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 d.i.) modelo DB-225, marca J.W. A temperatura do injetor foi de 250°C e a temperatura inicial do forno foi de 50°C, seguido de aumento gradual de 40°C por minuto, até atingir 220°C para acetatos de alditol, e 210°C para acetatos de alditol parcialmente metilados, mantendo-se constante a partir de 25 e 30 minutos, respectivamente. O gás de

arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetindo-se a cada 1/8 de segundo, e com relação massa/carga (m/z) de 90 a 220. Os cromatogramas foram analisados e as áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração utilizando o software Saturn Workstation 5.1. A identificação e quantificação dos acetatos de alditóis e dos acetatos de alditóis parcialmente metilados foi feita por meio da comparação entre os tempos de retenção e perfis de fragmentação da amostra, e os padrões (JANSSON *et al.*, 1976; SASSAKI *et al.*, 2005).

3.8.2 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance (HPSEC) Acoplada a Espalhamento de Luz Laser Multiângulos (MALLS) e Detector de Índice de Refração (RID)

As análises de homogeneidade dos polissacarídeos obtidos foram realizadas utilizando o cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (RID) WATERS modelo 2410, e com detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e $5 \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Para a análise, 1 mg de amostra foi diluída em 1 mL de eluente, o qual é composto por nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida de sódio (NaN_3 200 ppm) dissolvidos em água ultrapura (MilliQ). Esta mistura foi filtrada em membranas Millipore (acetato de celulose) de $0,22 \mu\text{m}$ antes da realização das análises. A análise foi realizada utilizando-se injeções de $100 \mu\text{L}$ de solução com fluxo de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, e os dados foram analisados através do software ASTRA (WYATT TECHNOLOGY).

Para determinação da massa molecular ponderal média (M_w) das frações homogêneas, foram preparadas soluções de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg das amostras em 1 mL de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1 M) e azida de sódio (NaN_3 200 ppm), previamente filtradas em membrana Millipore $0,22 \mu\text{m}$. As massas moleculares foram determinadas a partir do perfil de eluição e valores de dn/dc .

3.8.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro de modelo Bruker Avance DRX400 (Bruker Germany), em frequências base de 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), e em espectrômetro de modelo Bruker Avance III 600 (Bruker Germany), com frequências base de 150 MHz (^{13}C) e 600 MHz (^1H). As amostras foram solubilizadas em D_2O 99%, a uma concentração de 80 mg.mL^{-1} para as análises de ^{13}C e 20 mg.mL^{-1} para as análises de ^1H e bidimensionais, e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro externo. Os espectros foram obtidos em temperatura de 70°C . Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ^{13}C (31,45 ppm) como para ^1H (2,224 ppm).

O experimento de ^{13}C -DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) foi realizado em um ângulo de transferência de polarização θ_z de 135° , o qual permite a visualização de carbonos metilênicos (CH_2) na forma de sinais em fase negativa em relação à linha de base.

As análises bidimensionais apresentadas neste trabalho incluem os experimentos de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), COSY (*Correlation Spectroscopy*), TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) e NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). A análise por HSQC permite correlacionar os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio que estão ligados aos respectivos átomos de carbono; a análise por COSY permite correlacionar os deslocamentos químicos de átomos de hidrogênio vizinhos; a análise por TOCSY permite correlacionar os deslocamentos químicos entre todos os átomos de hidrogênio de uma molécula; a análise por NOESY permite correlacionar as ressonâncias de núcleos de hidrogênio que se encontram espacialmente próximos.

3.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL

Os ensaios biológicos para avaliação do potencial antitumoral conduzidos com os polissacarídeos nativos e modificados foram realizados em colaboração com

o grupo de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, em colaboração com a prof.^a Dr^a Sheila Maria Brochado Winnischofer.

3.9.1 Linhagens celulares utilizadas

Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados com células tumorais humanas de glioblastoma (linhagem U87MG) e melanoma metastático (linhagem WM9). A fim de verificar a citotoxicidade das frações em células humanas normais, foram realizados experimentos de viabilidade celular com a linhagem de fibroblastos MRC-5.

As linhagens U87MG e MRC-5 foram cedidas pela Prof.^a Mari Cleide Sogayar, do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL/NETCEM) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP).

A linhagem WM9 foi gentilmente cedida pelo Professor Meenhard Herlyn, do Wistar Institute (Philadelphia, PA, EUA), e enviadas ao nosso grupo pela Prof^a Dr^a Enilza Espreafico, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, SP, Brasil).

3.9.2 Esterilização dos materiais

Os materiais plásticos e vidrarias utilizados para os procedimentos de cultivo de células (frascos para soluções e meios de cultura, equipamentos para filtração das soluções, tampas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave (Prismatec, Modelo CS) a 120°C, por 45 min, sob pressão de 1 atm. As garrafas de cultivo, tubos falcons e tubos criogênicos foram esterilizados em micro-ondas, por 45 min, em potência de 50 W.

Após o processo de esterilização, os materiais foram colocados em estufa de secagem a 50°C (FANEM, Modelo Orion 505). O manejo das culturas celulares foi realizado em condições estéreis, no interior de cabine de fluxo laminar vertical (VECO - CFLV 12).

3.9.3 Soluções e meios de cultivo

3.9.3.1 Solução de tripsina-EDTA

Células aderidas foram soltas de seu substrato utilizando solução de tripsina. Esta solução foi composta por: 137 mM de NaCl; 5,4 mM de KCl; 5 mM de glucose; 0,42 mM de Na_2HPO_4 ; 0,44 mM de KH_2PO_4 ; 2,3 mM de NaHCO_3 ; 0,53 mM de EDTA; 50 mg% de tripsina.

Após o preparo, a solução de tripsina teve seu pH ajustado para 7,4 e foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22 μm (Millipore) sob pressão em aparelho Sartorius, em cabine de fluxo laminar vertical (VECO - CFLV 12), e armazenada a -20°C .

3.9.3.2 Solução salina-fosfato tamponada (PBS)

A solução salina-fosfato tamponada (PBS), utilizada para lavagem das células em cultura e durante o procedimento de coleta, é constituída por: 680 mM de NaCl; 13,4 mM de KCl; 40,5 mM de Na_2HPO_4 .

Esta solução de PBS foi preparada como solução estoque concentrada em 5 vezes, e foi diluída para posterior uso, com pH ajustado para 7,4, sendo esterilizada em autoclave (Prismatec, Modelo CS) nas condições previamente descritas, e armazenada a 4°C .

3.9.3.3 Meio DMEM

As linhagens U87MG e MRC-5 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) alta glucose (Sigma-Aldrich), reconstituído em água ultrapura (MilliQ). O ajuste do pH do meio para 7,4 foi feito através da adição de NaHCO_3 estéril (autoclavado) e o tamponamento foi realizado com HEPES (Sigma Aldrich). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de celulose com poro de 0,22 μm , sob pressão em aparelho Sartorius, em cabine de fluxo laminar vertical (VECO - CFLV 12). Para os experimentos, o meio DMEM alta glucose foi

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 100 U.mL^{-1} de penicilina (Sigma-Aldrich).

3.9.3.4 Meio TU

A linhagem WM9 foi cultivada em meio TU, composto de 80% do volume final de meio MCDB 153 (Sigma-Aldrich) e 20% do meio L15 de Leibovitz (Sigma-Aldrich). Estes dois meios são preparados separadamente e esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore) em aparelho Sartorius, em cabine de fluxo laminar vertical (VECO - CFLV 12). O meio TU foi suplementado com 2 mM de CaCl_2 (Merck), 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de insulina obtida de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich), 2% de soro fetal bovino (SFB – Gibco), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 100 U.mL^{-1} de penicilina (Sigma-Aldrich).

3.9.4 Manutenção e preservação das células em cultura

As células tumorais de glioma e melanoma, e as células normais de fibroblastos foram cultivadas em garrafas de poliestireno estéreis, em meios e suplementos correspondentes, como descrito anteriormente. As culturas foram mantidas em incubadora de CO_2 (atmosfera de 5% de CO_2) à temperatura constante de 37°C. De forma rotineira, a monocamada de células aderidas foi observada em microscópio invertido (Olympus, modelo CK2).

As trocas de meio foram realizadas em intervalos de 48 a 72 h, de acordo com a coloração do indicador de pH do meio de cultura. Ao atingir uma confluência de aproximadamente 80%, foram realizadas subculturas através da adição de solução de tripsina-EDTA, para desprender as células do substrato plástico.

Para o estoque das linhagens, aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células. mL^{-1} foram suspensas em meio de cultura correspondente e a elas foi adicionado DMSO (Merck) a 10% (v/v). As células em suspensão foram então aliqüotadas em tubos criogênicos e mantidas a -80°C durante 48 h, e na sequência armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C).

3.9.5 Preparo das frações polissacarídicas para os ensaios biológicos

As frações Gb1 e Gb1-OS foram solubilizadas em água ultrapura (MilliQ) na concentração de 5 mg.mL^{-1} e filtradas em filtro estéril de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore), em cabine de fluxo laminar vertical (VECO - CFLV 12). As soluções foram armazenadas em Eppendorfs estéreis a -20°C . Uma alíquota de cada fração filtrada foi retirada para dosagem de açúcares totais (DUBOIS *et al.*, 1956), a fim de ajustar as concentrações de polissacarídeos. A concentração escolhida para todas as análises com as linhagens U87MG, WM9 e MRC-5 foi de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo, diluído no meio de cultura correspondente. Esta escolha foi feita baseando-se nos resultados de ensaios de MTT realizados em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB 231, com as concentrações 25, 100 e $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo (ver Anexo I, p. 195), e com base na literatura prévia do nosso grupo de pesquisa (ROPELLATO *et al.*, 2015).

3.9.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi determinada através do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich), segundo Mosmann (1983), com algumas modificações.

As células de glioblastoma (U87MG), melanoma (WM9) e fibroblasto normal (MRC-5) foram contadas, e plaqueadas 8×10^3 células/poço em placa de 96 poços com volume final de $200 \text{ }\mu\text{L}$ em cada poço. Em seguida, a placa foi mantida em incubadora a 37°C , 5% CO_2 por 24 h, para a adesão das células nas placas. O meio de cultura foi removido e os polissacarídeos na concentração de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram adicionados, e a placa mantida por 72 h em incubadora a 37°C , 5% CO_2 . Após incubação, $20 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de MTT em HBSS (5 mg.mL^{-1}) foram adicionados. A placa foi novamente incubada por 3 h nas mesmas condições anteriores. Após esse período o MTT que não reagiu foi retirado e $200 \text{ }\mu\text{L}$ de DMSO foram adicionados para dissolver os sais de formazana formados. A absorbância foi medida em leitor de microplacas (TECAN INFINITE M200), em 545 nm , utilizando como branco o DMSO. A condição controle, representada como 100% de viabilidade celular, foi correspondente às células mantidas somente com meio de cultura. Os ensaios de

atividade antitumoral foram realizados em no mínimo três experimentos independentes e em sextuplicata para cada amostra.

3.9.7 Ensaio de viabilidade celular por vermelho neutro

A determinação da viabilidade celular por vermelho neutro foi realizada de acordo com os métodos descritos por Borenfreund e Puerner (1984) e Fotakis e Timbrell (2006). O preparo das amostras, o plaqueamento e o tratamento das células de glioblastoma (U87MG) e melanoma (WM9) foram conduzidos como descrito no item anterior. Após o tratamento, 20 μL de solução estoque de vermelho neutro ($550 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich) foram adicionados. A placa foi novamente incubada por 2 h nas mesmas condições anteriores. Após esse período o vermelho neutro que não reagiu foi retirado, as células foram lavadas com PBS e tratadas com 100 μL de solução de extração (etanol 50% e ácido acético glacial 1%, em água ultrapura). A absorbância foi medida em leitor de microplacas (TECAN INFINITE M200), em 550 nm. A condição controle, representada como 100% de viabilidade celular, foi correspondente às células mantidas somente com meio de cultura. Os ensaios de atividade antitumoral foram realizados em três experimentos independentes e em sextuplicata para cada amostra.

3.9.8 Ensaio de ciclo celular

Foram plaqueadas 1×10^5 células (U87MG e WM9) em placas de 12 poços (volume total de 1 mL) em meio correspondente à linhagem celular em avaliação. Após 24 h em incubadora a 37°C e 5% de CO_2 para adesão das células, o sobrenadante foi removido e as células foram tratadas com 1 mL das frações polissacarídicas ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) durante 72 h. Decorrido o tempo do tratamento, cada sobrenadante foi retirado e adicionado a um tubo Eppendorf de 2 mL. As células foram lavadas com 200 μL de PBS e os lavados foram coletados para seu Eppendorf correspondente. Então, as células foram desaderidas com 200 μL de tripsina-EDTA e a suspensão de células foi transferida para o Eppendorf correspondente, centrifugadas (1199 RCF, 1 min 30 seg, 4°C), formando um *pellet*

de células. O sobrenadante foi descartado e em seguida as células foram lavadas, a fim de eliminar qualquer quantidade de meio de cultivo. As células foram ressuspensas em 300 µL de PBS e Triton 0,1% e marcadas com 15 µL de uma solução de iodeto de propídio desnaturante (PI, Sigma-Aldrich), transferidas para um tubo de citometria, onde permaneceram durante 15 min protegidas da luz. Ao término deste processo, as células foram analisadas por citometria de fluxo no aparelho BD Accuri™ C6 e as análises foram realizadas pelo software BD Accuri C6.

3.9.9 Ensaio de morte celular por anexina e iodeto de propídeo

Foram plaqueadas 1×10^5 células (U87MG e WM9) em placa de 12 poços em meio correspondente à linhagem celular em avaliação. Após 24 h, o meio foi substituído por 1 mL de meio contendo os tratamentos com polissacarídeos (100 µg.mL⁻¹), sinvastatina (5 µM, controle positivo para apoptose, Merck) ou cisplatina (10 µM, controle positivo para apoptose tardia, Sigma-Aldrich). Após 72 h de incubação a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂, o sobrenadante foi coletado para seus respectivos Eppendorfs, as células foram lavadas com 200 µL de PBS, desaderidas da placa com 200 µL de solução de tripsina-EDTA e coletadas para seus respectivos Eppendorfs. Os poços foram lavados com 200 µL de PBS e cada material foi coletado para seus respectivos Eppendorfs. As células foram centrifugadas (1199 RCF, 1 min 30 seg, 4°C), o sobrenadante descartado e o *pellet* de células ressuspensas em tampão de ligação ou Triton 0,1%, e as células foram marcadas de acordo com a TABELA 4.

TABELA 4 – DILUIÇÕES E MARCAÇÕES PARA O ENSAIO DE MORTE CELULAR

	Tampão de ligação (µL)	Triton 0,1% (µL)	Anexina (µL)	PI 100 µg.mL ⁻¹ (µL)
Controle de necrose (PI)	-	199	-	1
Controle de apoptose (anexina)	197,5	-	2,5	-
Controle de apoptose tardia (anexina/PI)	196,5	-	2,5	1
Controle de células viáveis	200,0	-	-	-
Controle do experimento	196,5	-	2,5	1
Tratamentos com polissacarídeos	196,5	-	2,5	1

Ao término deste processo, as células foram analisadas por citometria de fluxo no aparelho BD Accuri™ C6 e as análises foram realizadas pelo software BD Accuri C6. Os resultados foram expressos como valores de porcentagem de células em cada quadrante em relação ao total de células.

3.9.10 Western blotting

3.9.10.1 Lise celular para extração de proteínas

Foram plaqueadas 1×10^6 células (WM9) em placas p100, as quais foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, por 24 h para adesão. Em seguida, foram tratadas com as soluções de polissacarídeos diluídas em meio de cultivo (100 µg.mL⁻¹) durante 72 h. Decorrido esse tempo, o meio de cultura foi descartado e as células foram desaderidas com tripsina e coletadas para Eppendorfs correspondentes. Estes foram centrifugados (1000 x g, 5 min, centrífuga HT MCD-2000). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspendido em PBS, o qual foi submetido a uma nova centrifugação (1000 x g, 5 min, centrífuga HT MCD-2000). O novo *pellet* de células foi armazenado a -80°C, até o momento da lise.

A lise celular para extração de proteínas foi realizada através da adição de 500 µL de tampão RIPA gelado (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% de desoxicolato de sódio; 1% de Triton X-100; 150 mM de NaCl; 0,1% de SDS) suplementado com inibidores de protease e inibidores de fosfatases (Na₄P₂O₇, Na₃VO₄ e β-glicerofosfato). Em seguida os Eppendorfs foram homogeneizados em vortex e mantidos em banho de gelo (4°C) por 30 minutos. Os lisados obtidos foram centrifugados (15000 x g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante contendo as proteínas extraídas foi transferido para outro Eppendorf. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250; 5% etanol; 8,5% ácido fosfórico).

3.9.10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), foi adicionado tampão de amostra redutor (concentrações finais de 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β -mercaptoetanol; 0,1% azul de bromofenol) a 100 μ g de proteínas. A mistura foi fervida por 10 min e as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) (SDS-PAGE), utilizando tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 250 mM Glicina; 0,1% SDS) (LAEMMLI, 1970). Para a separação foi aplicada uma diferença de potencial de 80 V. A eletroforese foi conduzida até que o azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel.

As proteínas separadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose através da adição de tampão de transferência (48 mM Tris-HCl, 39 mM glicina, 0,037% SDS e 20% metanol) (TOWBIN *et al.*, 1979). A transferência foi conduzida por 1h30 em cuba de transferência semi-seca (BioRad) com corrente de 25V. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi confirmada pela coloração do gel após a transferência com 0,5% de Comassie R-250 (em água:metanol:ácido acético, 60:30:10) e pela coloração da membrana com o corante solúvel de Ponceau.

3.9.10.3 Detecção de caspase 3

A membrana de nitrocelulose contendo as proteínas foi lavada com TBST (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20) até remoção total do corante Ponceau, e foi incubada em solução de bloqueio (5% leite desnatado em TBST) durante 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com solução do anticorpo primário de interesse (caspase 3, diluição 1:300, Biocare Medical) overnight à 4°C. Após incubação, a membrana foi lavada 4 vezes com TBST, durante 10 min em cada lavagem, a fim de remover os anticorpos não ligados ou com ligações não específicas mais fracas. A membrana com os anticorpos primários ligados foi incubada com uma solução do anticorpo secundário específico (caspase 3 conjugada à peroxidase, diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), durante 1 h, e em seguida lavada quatro vezes por 10 minutos com TBST.

A revelação foi realizada pela incubação da membrana com um substrato quimioluminescente da peroxidase (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A quimioluminescência foi detectada utilizando o equipamento Amersham™ Imager 600, após exposição por 20 segundos.

3.9.11 Ensaio de migração celular por *Scratch in vitro*

A fim de verificar se as heteroramnanas de *G. brasiliensis* são capazes de alterar a migração celular, foi realizado o ensaio de “*Scratch in vitro*”.

Foram plaqueadas 1×10^4 células (WM9) em placas de 96 poços, e incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, até atingirem máxima confluência. Em seguida, o meio foi retirado, e as células foram tratadas durante 15 min com 100 µL do composto anti-proliferativo mitomicina ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio sem soro, Sigma-Aldrich). Na sequência, foi feita uma lacuna contínua pela superfície da placa com o auxílio de uma ponteira P200, e o meio de cultura contendo células soltas foi retirado após lavagem com PBS. As células foram tratadas com solução de meio sem soro contendo os polissacarídeos ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 e 48 h. Decorrido cada tempo, as células foram analisadas em microscópio de contraste de fase (ZEISS Axiovert 40 CFL), com aumento de 5x. As análises foram feitas através da medida da largura da lacuna, em µm, em 3 campos para cada condição, utilizando o software ImageJ. A condição controle do experimento foi considerada como 100% de migração.

3.9.12 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio (ROS)

A fim de determinar se as heteroramnanas de *G. brasiliensis* são capazes de alterar os níveis intracelulares de espécies reativas do oxigênio (ROS), foi realizada a determinação dos níveis de ROS após tratamento com os polissacarídeos, através da avaliação da oxidação da sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA é um composto não fluorescente e permeável à membrana celular que, quando incorporado pelas células é convertido por esterases

a DCFH. Na presença de espécies reativas de oxigênio, o DCFH é oxidado a DCF (fluorescente), permitindo sua detecção e quantificação intracelular.

Foram plaqueadas 8×10^3 células (WM9) em placa ótica de 96 poços, e mantidas por 24 h em incubadora a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ para adesão. Em seguida, o meio foi retirado e as células foram tratadas com os diferentes polissacarídeos ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e novamente incubadas por 72 h. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi retirado e 200 μL de PBS com 5 μL de solução de DCFH-DA 2 mM (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. Após 30 min de incubação, foi realizada a leitura da fluorescência em leitor de microplacas (TECAN-Infinite M200), em 405 nm (excitação) e 520 nm (emissão). Como controle positivo de oxidação, as células foram expostas por 3 h a uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 200 μM diluído em PBS.

3.9.13 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para este ensaio, foram plaqueadas 5×10^3 células (U87MG e WM9) em lamínulas circulares (EMS, 13 mm diâmetro), em placas de 24 poços. As células foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, por 24 h para adesão. Em seguida, o meio foi retirado e as células foram tratadas com os polissacarídeos diluídos em meio de cultura ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), durante 72 h. Após o tratamento, o meio foi retirado e as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4, 37°C) e fixadas com solução de Karnovski (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, CaCl₂ 1 mM em tampão cacodilato 0,1 M) por 1 h. Após fixação, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e desidratadas com diferentes concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), por 10 min em cada concentração. Após desidratação completa, cada lamínula contendo as células tratadas ou não foram submetidas ao ponto crítico (CPD 010 Critical Point Dryer 030 – Balzers), metalização com ouro (SCD 030 – Balzers), e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (TESCAN VEGA 3 LMU).

3.9.14 Análise de Imunofluorescência

Um total de 5×10^3 células (U87MG e WM9) foram plaqueadas em lamínulas circulares (EMS, 13 mm diâmetro), em placas de 24 poços. As células foram mantidas por 24 h a 37°C em incubadora de CO₂ (atmosfera de 5% de CO₂). Em seguida, o meio foi aspirado e as células foram tratadas com os polissacarídeos diluídos em meio de cultura ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), por um período de 72 h. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e fixadas em solução de paraformaldeído 2% em PBS por 20 min (Electron Microscopy Sciences, EUA). Em seguida a solução fixadora foi retirada, as células foram lavadas com PBS, e incubadas com solução de glicina 0,1% por 2 min (Merck, Alemanha), para bloqueio dos radicais aldeídicos. Após nova lavagem com PBS, as células foram incubadas com solução de PBS, BSA 1%, saponina 0,01% por 30 min. Para a detecção dos microfilamentos de actina, empregou-se a sonda faloidina acoplada com Alexa Fluor 488 1:1000 (Molecular Probes, EUA), por 20 min. Após o período de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, e empregou-se o DAPI 3 μM em PBS (Molecular Probes, EUA), por 15 min, para marcação do núcleo celular. Ao final da incubação, as células foram lavadas com PBS por 2 vezes, lavadas rapidamente em água destilada e então montadas em lâminas histológicas com Fluoromont G 2:1 em PBS (Electron Microscopy Sciences, EUA). O material foi analisado em Microscópio Confocal Radiance 2100 da Bio Rad (Bio Rad Hercules, Richmond, CA, EUA).

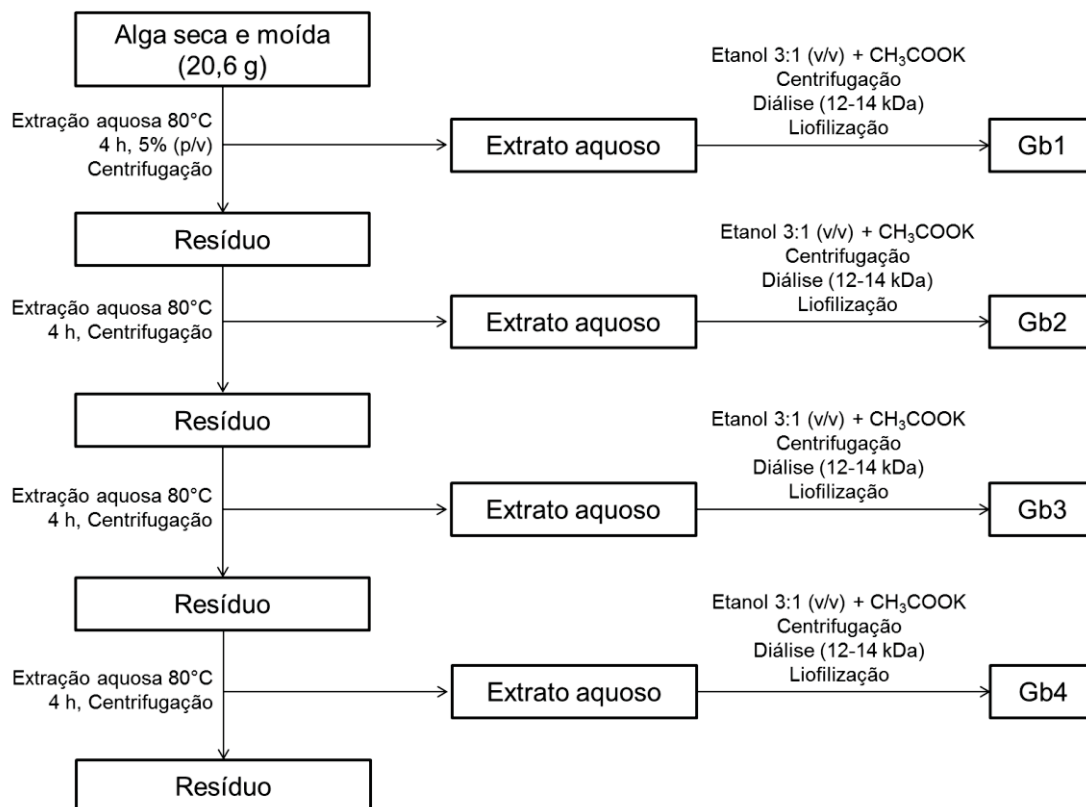
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. brasiliensis*

4.1.1 Extração das frações brutas de *G. brasiliensis*

Espécimes da alga verde *G. brasiliensis* (Ulotrichales), foram coletados da baía de Guaratuba-PR em setembro de 2013. As algas secas e moídas (20,6 g) foram submetidas a 4 extrações aquosas sequenciais em concentração 5% (p/v), temperatura de 80°C, sob agitação mecânica, por 4 h. Após cada etapa, os extratos foram tratados com etanol P.A. (3:1 v/v) e acetato de potássio (CH_3COOK) para precipitação dos polissacarídeos. Após centrifugação (7700 x g, 20 min, 5°C), os polissacarídeos foram ressolubilizados em água destilada, dialisados sequencialmente (membrana *cut off* de 12 a 14 kDa) contra água destilada, NaCl 1 M, e água destilada, e liofilizados (FIGURA 10).

As frações polissacarídicas obtidas foram denominadas Gb1, Gb2, Gb3 e Gb4, e referem-se à espécie da alga a partir da qual foram obtidos (Gb = *Gayralia brasiliensis*) e à ordem de extrações realizadas (1 a 4). A biomassa residual de alga foi liofilizada e armazenada a -20°C. Os rendimentos estão apresentados na TABELA 5.

FIGURA 10 FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *G. brasiliensis*

4.1.2 Análises químicas das frações brutas de *G. brasiliensis*

O rendimento total dos polissacarídeos brutos em relação à massa inicial de alga submetida às extrações foi de 45% (TABELA 5). Estes resultados são superiores àqueles obtidos por Cassolato *et al* (2008) (38%), Ropellato *et al* (2015) (19%) e De Carvalho (2013) (10%) para a alga *Gayralia oxysperma*, e semelhantes aos obtidos por Berté (2013) para a alga *G. brasiliensis*.

As frações brutas apresentaram teor de carboidratos variável entre 47 e 64,6%, e baixo teor de proteínas (2 a 4,3%). Adicionalmente, foi observado alto teor de grupos sulfato (29 a 36,8%) e presença de ácidos urônicos (12,3 a 13,4%), o que permite concluir que são polímeros ácidos. Estes resultados são semelhantes aos observados para os polissacarídeos brutos de *G. oxysperma* e *G. brasiliensis*, os quais foram submetidos às mesmas condições de extração (CASSOLATO *et al.*, 2008; BERTÉ, 2013; DE CARVALHO, 2013; ROPELLATO *et al.*, 2015).

TABELA 5 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. brasiliensis*

Fração	Rendimento ^a (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Ác. Urônico ^d (%)	Proteína ^e (%)	[α] _D ²⁰ (°)
Gb1	33	64,6	29,3	12,3	2,0	-34,2
Gb2	7	63,4	36,3	13,4	4,3	-36,0
Gb3	3	60,3	36,8	12,6	3,0	-31,7
Gb4	2	47,7	36,8	12,8	3,3	-32,9

FONTE: o autor (2017). ^a Os rendimentos foram calculados em relação à massa inicial de alga seca e moída. Determinações colorimétricas de acordo com os métodos: ^b DUBOIS *et al* (1956), ^c DODGSON e PRICE (1962), ^d FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991), e ^e LOWRY *et al* (1959).

Ácidos urônicos são constituintes de polímeros produzidos por outras espécies de algas verdes da ordem Ulotrichales, tais como *Monostroma latissimum*, *M. nitidum*, *M. oxyspermum* e *M. angicava* (TABELA 1, p. 37), os quais estão em menor proporção quando comparados com os polissacarídeos de espécies do gênero *Gayralia* (LEE *et al.*, 1998; MAO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2017).

Adicionalmente, os valores de rotação óptica das frações apresentaram-se negativos (-31,7 a -36,0), uma vez que as frações são compostas majoritariamente pelo monossacarídeo α-L-ramnose. Os valores de rotação óptica são semelhantes aos obtidos para as heteroramnanas de *G. oxysperma* (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELLATO *et al.*, 2015).

4.1.3 Composição monossacarídica das frações brutas de *G. brasiliensis*

As análises de composição monossacarídica foram realizadas após hidrólise, redução, acetilação das frações brutas, e análise por GC-MS. Os resultados estão apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. brasiliensis*

Frações	Monossacarídeos (mol%) ^a			
	Rha ^b	Xyl	Gal	Glc
Gb1	69,9	10,5	5,5	14,1
Gb2	71,7	9,5	2,0	16,8
Gb3	79,7	10,1	2,4	7,8
Gb4	74,4	11,5	1,5	12,6

FONTE: o autor (2017). ^a Monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis. ^b abreviatura dos monossacarídeos: Rha = ramnose; Xyl = xilose; Gal = galactose; Glc = glucose.

O principal monossacarídeo neutro presente nas frações é a ramnose (69,9 a 79,7 mol%), seguido de glucose (7,8 a 16,8 mol%), xilose (9,5 a 11,5 mol%), e menores quantidades de galactose (1,5 a 5,5 mol%). As frações brutas de *G. oxysperma*, obtidas pelo mesmo processo de extração, também são constituídas por ramnose, xilose, galactose e glucose como monossacarídeos principais, com baixas proporções de arabinose, manose e 3-metil-galactose (3,0 a 10,1% de arabinose, 1,2 a 2,5% de manose e 2,5 a 9,2% de 3-metil-galactose) (CASSOLATO *et al.*, 2008; DE CARVALHO, 2013; ROPELLATO *et al.*, 2015). Adicionalmente, os polissacarídeos de diferentes espécies de algas do gênero *Monostroma* são constituídos majoritariamente por ramnose, xilose e glucose, além de baixas percentagens de galactose, manose e arabinose (HARADA; MAEDA, 1998; LEE *et al.*, 1998; MAO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017).

4.1.4 Análises de RMN de ¹³C das frações brutas de *G. brasiliensis*

As análises dos espectros de RMN de ¹³C das frações brutas (FIGURA 11) foram realizadas através da comparação com os assinalamentos descritos por Cassolato *et al* (2008) e Ropellato *et al* (2015) para *G. oxysperma*.

Os espectros das frações Gb1 a Gb4 são complexos, com sinais alargados e sobrepostos, o que sugere a presença de diferentes padrões de substituição da molécula. São qualitativamente semelhantes entre si, apresentando na região

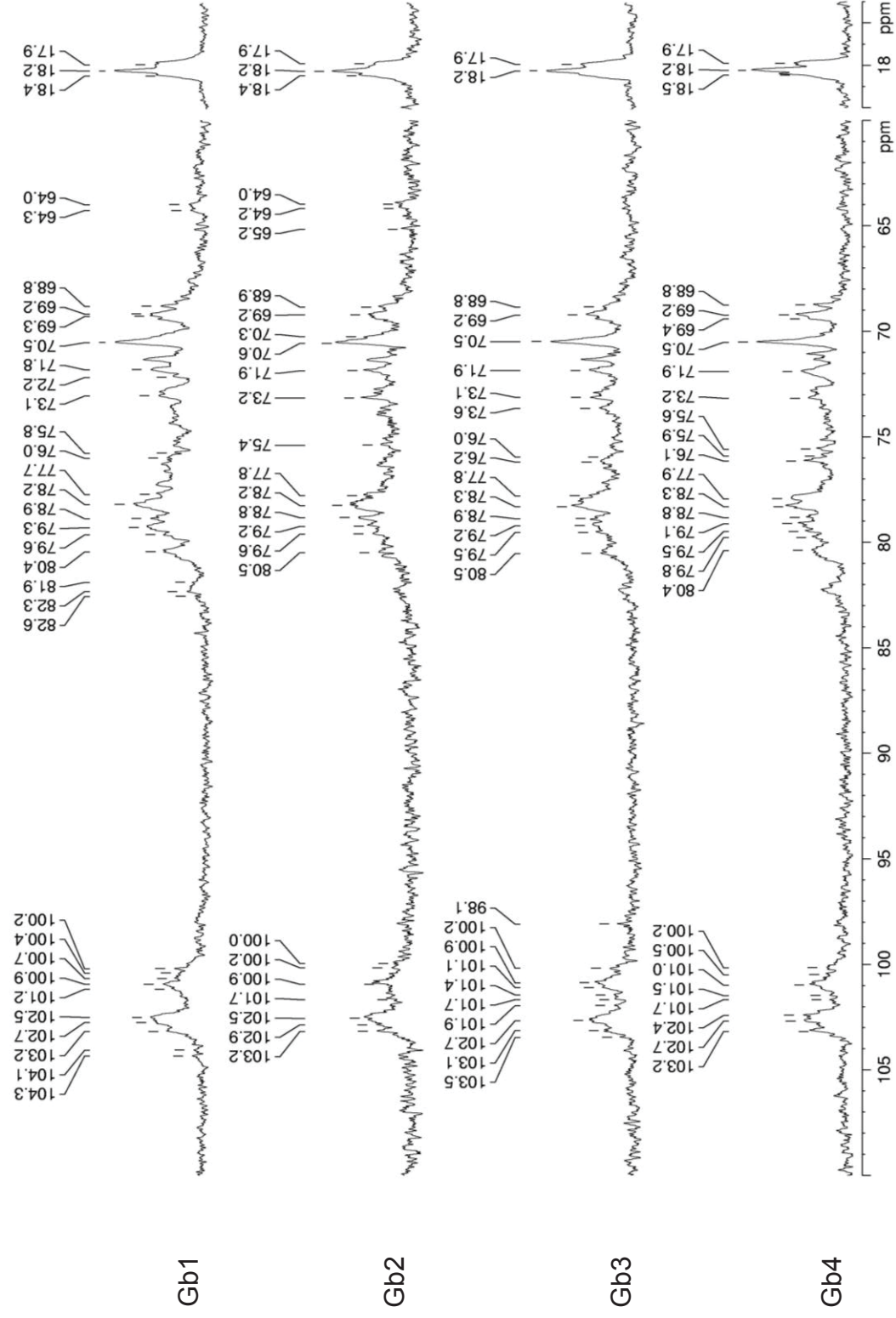
anomérica sinais entre 103,5 e 98,1 ppm, atribuídos principalmente a unidades de α -L-ramnose (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELLATO *et al.*, 2015). Adicionalmente, sinais entre 104,1 e 104,3 ppm foram atribuídos ao C-1 de unidades monossacarídicas de anomeridade β (CASSOLATO *et al.*, 2008). Na região entre 18,5 e 17,9 ppm, observam-se sinais intensos correspondentes ao C-6 das unidades de ramnose, o que está de acordo com a composição monossacarídica (69,9 a 79,7 mol% de ramnose, TABELA 6).

A configuração α -anomérica das unidades de ramnose foi deduzida pela presença dos sinais na região de 70,3 a 70,6 ppm em todos os espectros das frações brutas (FIGURA 11), os quais foram atribuídos ao C-5 de unidades de α -L-ramnose (BACKINOWSKY *et al.*, 1980; LIPKIND *et al.*, 1988; JANSSON *et al.*, 1989). Adicionalmente, os espectros de HSQC da fração Gb1 (TABELA 14 e FIGURA 23) mostram correlações de ~70,5 ppm com sinais entre 3,90 e 3,83 ppm, atribuídos ao C-5/H-5 de unidades de α -L-ramnose. Por outro lado, os sinais de C-5/H-5 característicos de unidades de ramnose com configuração β -anomérica são próximos de 72,3 a 73,4 ppm e 3,39 ppm, os quais não estão presentes no espectros de RMN das frações obtidas de *G. brasiliensis* (BACKINOWSKY *et al.*, 1980; LIPKIND *et al.*, 1988; JANSSON *et al.*, 1989).

Ainda foi possível observar sinais de baixa intensidade em 64,0 a 64,3 ppm, correspondentes ao C-5 de unidades de xilose 4-ligadas, assim como em 65,2 ppm, referentes ao C-5 de xilose presentes como terminal não redutor. Estes assinalamentos estão de acordo com os previamente obtidos para as heteroramnanas sulfatadas da alga verde *Gayralia oxysperma* (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELLATO *et al.*, 2015).

As análises de composição química, monossacarídica e RMN de ^{13}C das frações brutas estão de acordo com os dados obtidos para os polissacarídeos de *G. oxysperma*, indicando que *G. brasiliensis* também sintetiza heteroramnanas sulfatadas.

FIGURA 11 ESPECTRO DE ^{13}C DAS HETERORAMNANAS SULFATADAS Gb1 - Gb4 DE *G. brasiliensis*

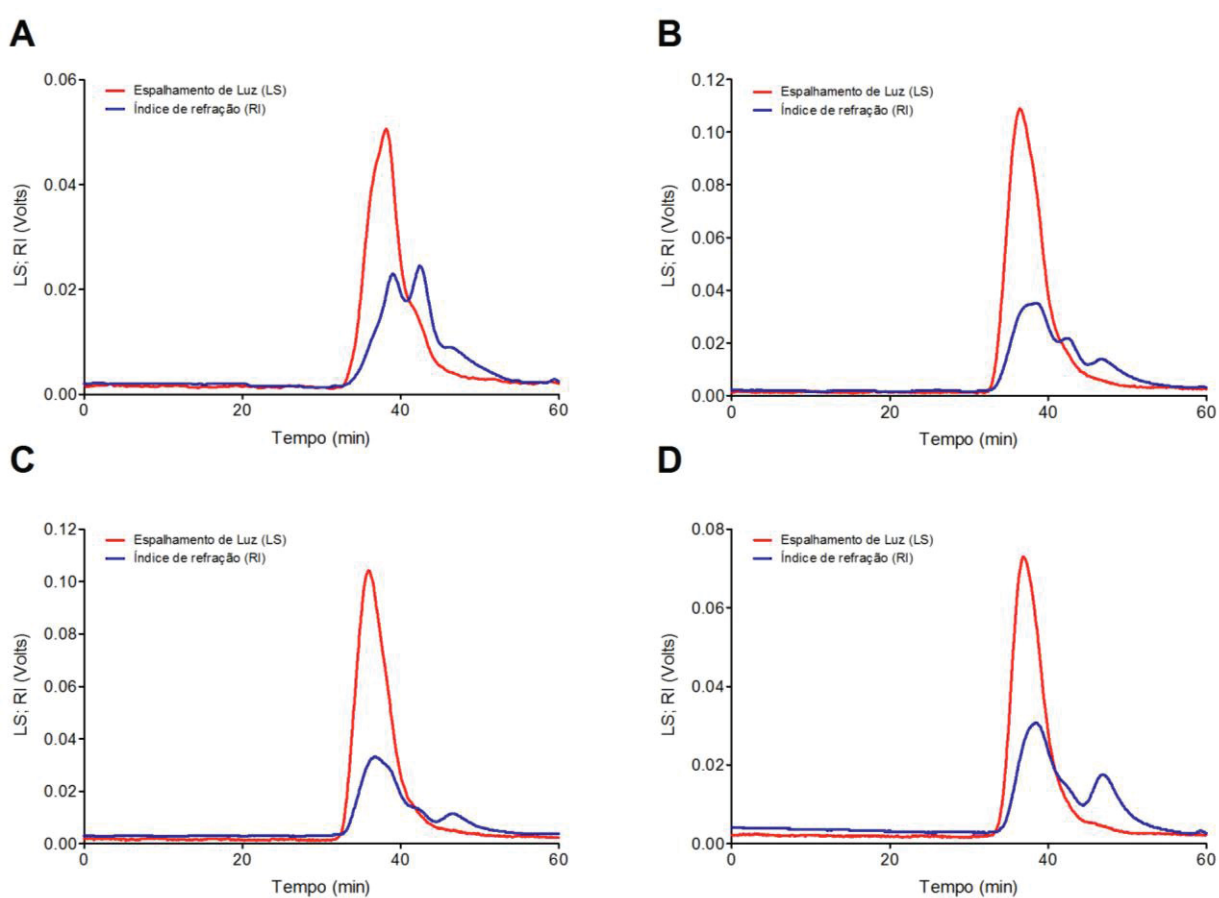


Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

4.1.5 Análise de homogeneidade das frações brutas de *G. brasiliensis*

A análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-RI das frações brutas mostrou que todas apresentaram perfil polidisperso, indicando a presença de polímeros com diferentes massas (FIGURA 12).

FIGURA 12 CROMATOGRAMAS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RID DAS FRAÇÕES BRUTAS Gb1 (A), Gb2 (B), Gb3 (C) E Gb4 (D).



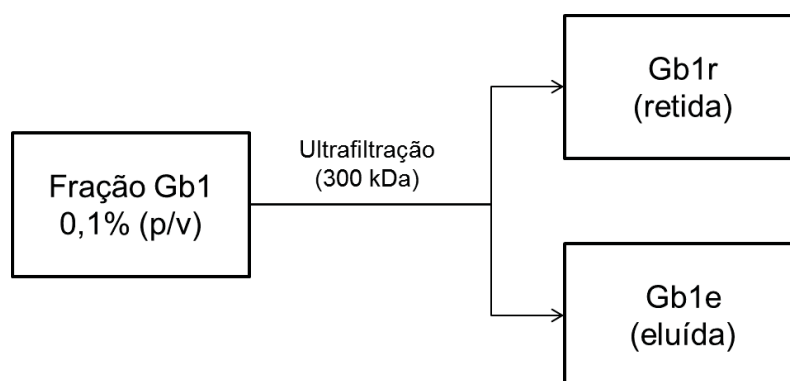
Visto que todas as frações apresentaram perfil heterogêneo, a fração de maior rendimento Gb1 (33%) foi selecionada para o processo de purificação e posterior caracterização estrutural.

4.2 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA Gb1

4.2.1 Ultrafiltração em membrana

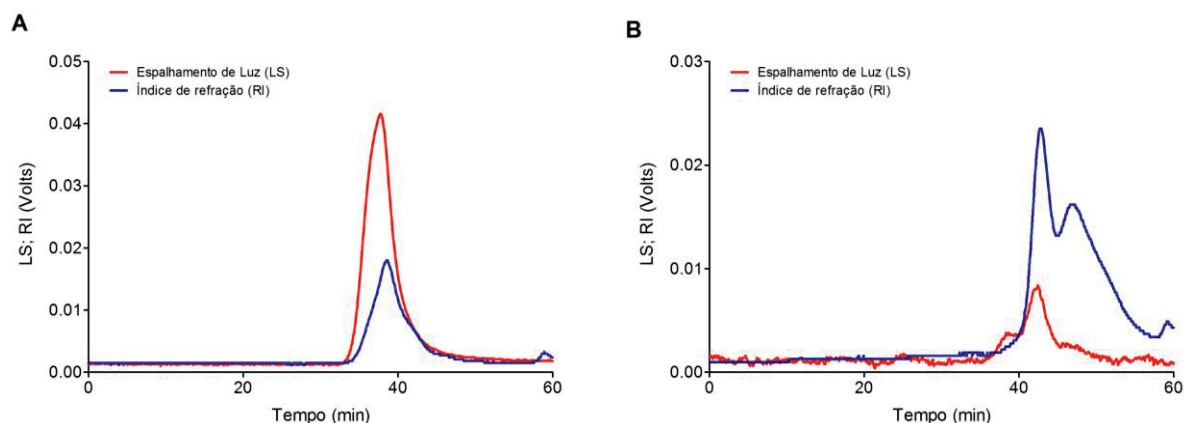
A fim de obter uma fração purificada para determinação da estrutura química fina, a fração Gb1 (200 mg) foi solubilizada em água destilada na concentração de 0,1% (p/v) e a mistura foi submetida à ultrafiltração em membrana de 300 kDa. O processo gerou uma fração retida que foi denominada de Gb1r e uma fração eluída que foi denominada de Gb1e (FIGURA 13). O rendimento total do processo foi de 75,3%, sendo 33,4% para Gb1r e 41,9% para Gb1e.

FIGURA 13 FLUXOGRAMA DE ULTRAFILTRAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA Gb1



As frações foram analisadas por HPSEC-MALLS-RI e os cromatogramas são apresentados na FIGURA 14.

FIGURA 14 CROMATOGRAMAS DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RI DAS FRAÇÕES Gb1r (A) E Gb1e (B)

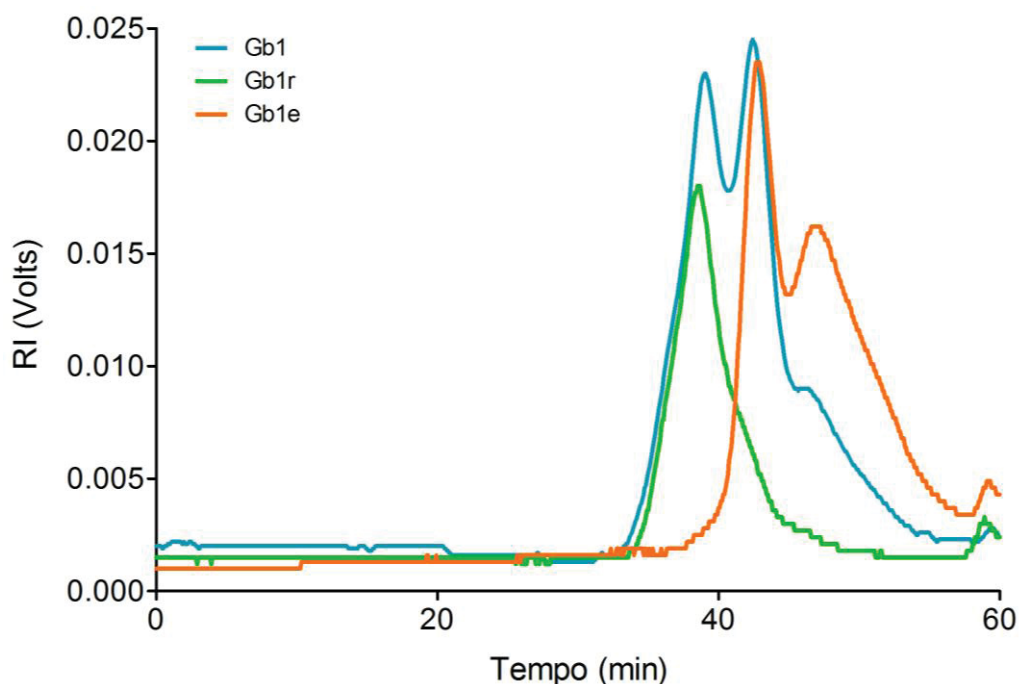


A partir da análise por HPSEC-MALLS-RI, observa-se que fração Gb1r apresentou um pico simétrico, indicando perfil homogêneo. O valor de dn/dc foi calculado em 0,117 e a partir deste valor foi calculada a massa molecular ponderal média da fração Gb1r, em $1,371 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$.

A massa molecular determinada para esta heteroramnana sulfatada foi maior do que para a maioria das outras ramnanas obtidas de algas do gênero *Monostroma*, as quais variam entre $3,35 \times 10^4$ e $8,7 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, e foi semelhante à obtida para as heteroramnanas de *G. oxysperma* ($1,519 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$) (CASSOLATO *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; SEEDEVI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017).

Para fins de comparação do processo de purificação, os cromatogramas obtidos por HPSEC-MALLS-RI a partir do detector de índice de refração (RI) foram sobrepostos (FIGURA 15).

FIGURA 15 CROMATOGRAMAS DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r e Gb1e



4.2.2 Análises químicas da fração homogênea Gb1r

As frações Gb1r e Gb1e, obtidas após ultrafiltração, foram analisadas quanto aos teores de carboidratos, sulfato e ácidos urônicos (TABELA 7).

TABELA 7 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Gb1r e Gb1e

Fração	Rendimento (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Ác. Urônico ^d (%)	Proteína ^e (%)
Gb1	33	64,6	29,3	12,3	2,0
Gb1r	33,4 ^a	42,8	29,1	12,8	n.d.
Gb1e	41,9 ^a	47,2	n.d.	11,4	n.d.

FONTE: o autor (2017). ^a percentagem em relação à massa inicial de material utilizado na purificação. Determinações colorimétricas de acordo com os métodos: ^b DUBOIS *et al* (1956), ^c DODGSON e PRICE (1962), ^d FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991), e ^e LOWRY *et al* (1959). n.d. = não determinado.

Foi possível observar que a fração Gb1r apresentou teores de sulfato e ácidos urônicos muito semelhantes à fração nativa, Gb1. Os resultados das análises químicas obtidos para Gb1r estão dentro da média em comparação com outras frações pertencentes ao gênero *Monostroma*, e também com *G. oxysperma* (CASSOLATO *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008; MAO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; ROPELLATO *et al.*, 2015; SEEDEVI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017).

4.2.3 Composição monossacarídica em termos de monossacarídeos neutros das frações Gb1r e Gb1e

Em relação à composição monossacarídica, a fração Gb1r apresentou-se semelhante à fração Gb1. A fração Gb1e foi mais rica em glucose e galactose (TABELA 8).

TABELA 8 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. brasiliensis*

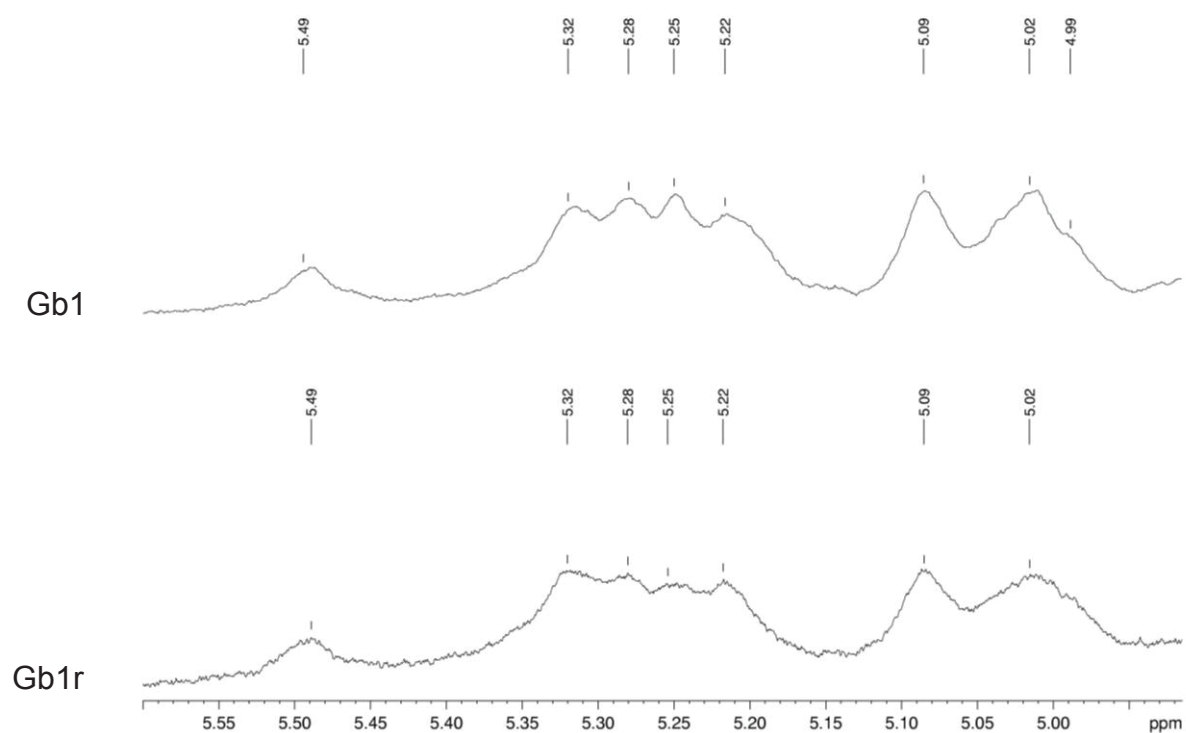
Frações	Monossacarídeos (mol%) ^a			
	Rha ^b	Xyl	Gal	Glc
Gb1 ^c	69,9	10,5	5,5	14,1
Gb1r	77,6	8,9	3,1	10,3
Gb1e	58,5	9,9	7,4	19,1

FONTE: o autor (2017). ^a Monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis. ^b abreviatura dos monossacarídeos: Rha = ramnose; Xyl = xilose; Gal = galactose; Glc = glucose. ^c Fração incluída para fins comparativos.

4.2.4 Análises de RMN de ¹H e ¹³C da fração Gb1r

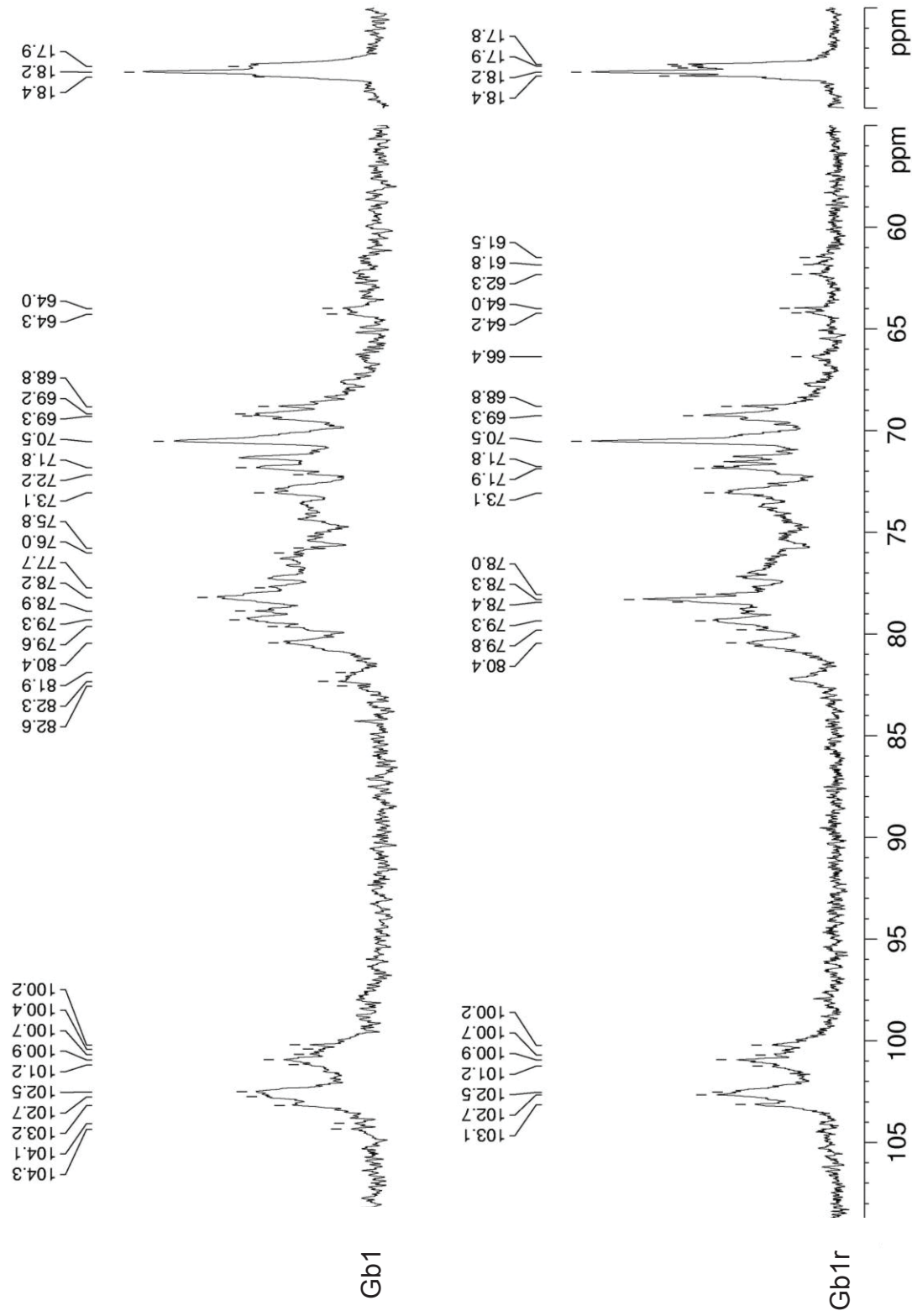
As análises de RMN monodimensionais (¹H e ¹³C) foram conduzidas com a fração Gb1r, e comparadas qualitativamente com as análises da fração nativa Gb1. A região anomérica dos espectros de ¹H de Gb1 e Gb1r são semelhantes (FIGURA 16). Os sinais entre 5,49 e 4,99 ppm foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos de unidades de α-L-ramnose (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELLATO *et al.*, 2015).

Adicionalmente, os espectros de ¹³C também apresentaram-se similares (FIGURA 17). Observa-se que a complexidade de sinais alargados e sobrepostos permanece após a purificação, na fração Gb1r. Os sinais anoméricos entre 103,1 e 100,2 ppm foram atribuídos às unidades de α-L-ramnose, e a região entre 18,5 e 17,9 ppm corresponde ao C-6 de unidades de ramnose. Os sinais na região de 70,3 a 70,6 ppm foram atribuídos ao C-5 das unidades α-anoméricas de ramnose, como discutido no item 4.1.4. Além disto, o espectro da fração Gb1r apresentou melhor definição dos sinais na região de 61,5 a 66,4 ppm, sugerindo a presença de C-6 livre de hexoses (61,5 a 62,3 ppm), C-5 de unidades de xilose 4-ligadas (64,0 e 64,2 ppm) e C-5 de terminais não redutores de xilose (66,4 ppm) (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELLATO *et al.*, 2015).

FIGURA 16 REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE ^1H DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1r.

Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 2,225 ppm

FIGURA 17 ESPECTROS DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1r.



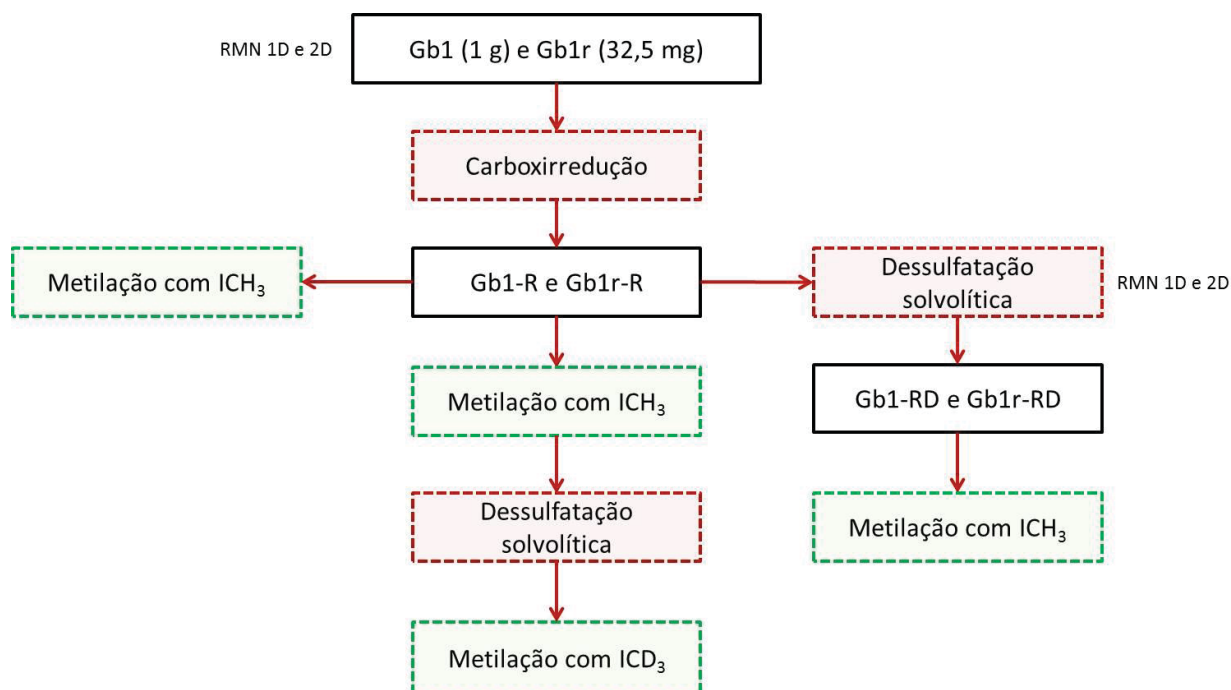
Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C. Acetona como padrão interno: 31,45 ppm

Visto que a fração Gb1r apresentou semelhança entre suas análises químicas, composição monossacarídica e perfil dos espectros de RMN monodimensionais em relação à fração nativa Gb1, a caracterização química fina foi realizada em paralelo com as duas frações, a fim de determinar em detalhes eventuais diferenças estruturais entre elas.

4.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1r

Com o objetivo de determinar a estrutura química fina das frações Gb1 e Gb1r, estes polímeros foram submetidos a diferentes processos químicos, tais como carboxirredução, metilação, dessulfatação solvolítica e trideuteriometilação, além de análises espectroscópicas de RMN uni e bidimensionais. A FIGURA 18 resume a sequência das reações químicas utilizadas.

FIGURA 18 SEQUÊNCIA METODOLÓGICA PARA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL FINA DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1r

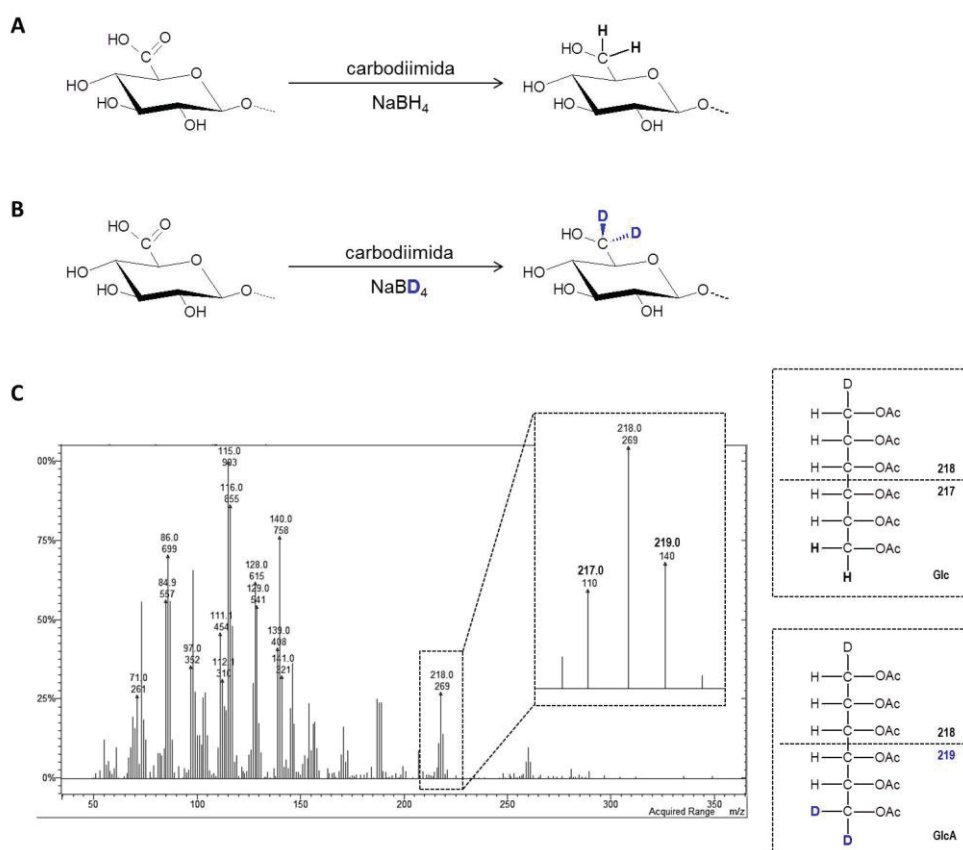


Nota: caixas vermelhas representam as reações químicas utilizadas; caixas verdes representam as reações de metilação cujos resultados foram utilizados para análises comparativas. Gb1-R: fração Gb1 carboxirreduzida. Gb1r-R: fração Gb1r carboxirreduzida. Gb1-RD: fração Gb1 carboxirreduzida/dessulfatada. Gb1r-RD: fração Gb1r carboxirreduzida/dessulfatada.

4.3.1 Carboxirredução das frações Gb1 e Gb1r

A fim de identificar e quantificar os ácidos urônicos presentes nas frações Gb1 e Gb1r, foi realizada a carboxirredução na presença de 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida e NaBD_4 (Taylor e Conrad, 1972), reação na qual os ácidos urônicos presentes no polissacarídeo são convertidos aos seus respectivos monossacarídeos neutros. A partir da análise da composição monossacarídica por GC-MS do polímero carboxirreduzido com NaBD_4 , é possível diferenciar os monossacarídeos provenientes dos ácidos urônicos dos monossacarídeos neutros pré-existentes no polímero, uma vez que apresentam duas unidades de massa a mais em C-6. O perfil de fragmentação de massa dos monossacarídeos após análise por GC-MS mostra a presença do íon 217 referente à hexose original e do íon 219 referente à hexose originada a partir do ácido urônico (CASSOLATO, 2008; ROPELATTO, 2011) (FIGURA 19).

FIGURA 19 EXEMPLO DE CARBOXIRREDUÇÃO NA PRESENÇA DE NaBH_4 (A) E NaBD_4 (B). FRAGMENTOS DE MASSA REFERENTES À HEXOSE NEUTRA (217) E HEXOSE ORIGINADA DE ÁCIDO URÔNICO (C)



Além de permitir a identificação e quantificação dos ácidos urônicos presentes no polímero, a reação de carboxirredução permite a correta determinação da composição monossacarídica, uma vez que os monossacarídeos ácidos impedem a hidrólise completa das ligações glicosídicas das unidades monossacarídicas adjacentes (BEMILLER, 1967).

As frações Gb1 e Gb1r foram submetidas à carboxirredução como previamente descrito no item 3.7.2, originando as frações carboxirreduzidas Gb1-R (88,3% de rendimento) e Gb1r-R (84,6% de rendimento), respectivamente. Foi realizada a dosagem de ácidos urônicos, a partir da qual se observou a conversão de 83,7% e 87,5% dos ácidos urônicos a monossacarídeos neutros, respectivamente.

Os resultados da composição monossacarídica da fração Gb1-R demonstraram aumento no conteúdo de galactose (5,5 → 10 mol%) e glucose (14,1 → 16,9 mol%) quando comparados com a fração original, evidenciando a presença de ácido galacturônico e glucurônico nesta fração. O derivado glucitol hexaacetato apresentou os íons de m/z 217 e 219 na percentagem relativa de 47,3 e 52,7%, respectivamente. Deste modo, dos 16,9 mol% de glucose presentes na fração carboxirreduzida é possível determinar que a fração Gb1 contém 8,0 mol% de glucose e 8,9 mol% de ácido glucurônico. De modo similar, o derivado galactitol hexaacetato apresenta os íons com m/z de 217 e 219 na percentagem relativa de 73 e 27%, respectivamente. Portanto, Gb1 é constituída por 7,3 e 2,7 mol% de galactose e ácido galacturônico, respectivamente. Estes dados estão resumidos na TABELA 9.

Da mesma forma, a fração Gb1r-R apresentou aumento no conteúdo de galactose (3,1 → 7,8 mol%) e glucose (10,3 → 19,1 mol%) quando comparada com a fração original, sugerindo a presença de ácido galacturônico e glucurônico. Após análise da porcentagem relativa dos íons 217 e 219, foi determinado que 30,9% e 56% de galactitol e glucitol hexaacetatos correspondem a 1,6,6-trideutero-galactitol e 1,6,6-trideutero-glucitol hexaacetatos, respectivamente. Portanto, dos 7,8 mol% de galactose, 2,4 mol% correspondem a ácido galacturônico, e dos 19,1 mol% de glucose, 10,7 mol% correspondem a ácido glucurônico (TABELA 9).

TABELA 9 – RENDIMENTOS, TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1r ANTES E APÓS CARBOXIRREDUÇÃO

Fração	Rendimento (%)	Ácido urônico ^a (%)	Monossacarídeos (mol%) ^b			
			Rha	Xyl	Gal	Glc
Gb1 ^c	33	12,3	69,9	10,5	5,5	14,1
Gb1-R	88,3 ^d	2,0	64,3	8,8	10,0 (2,7)	16,9 (8,9)
Gb1r ^c	33,4	12,8	77,6	8,9	3,1	10,3
Gb1r-R	84,6 ^d	1,6	66,5	6,6	7,8 (2,4)	19,1 (10,7)

FONTE: o autor (2017). ^a segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). ^b monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis. Os números entre parênteses correspondem à % de GalA e GlcA quantificados como 1,6,6-trideuterio galactitol hexaacetato e 1,6,6-trideuterio glucitol hexaacetato, respectivamente. ^c composição monossacarídica das frações sem carboxirredução, para fins comparativos. ^d rendimento em relação ao material submetido a carboxirredução.

4.3.2 Dessulfatação solvolítica das frações Gb1-R e Gb1r-R

Com o objetivo de determinar o posicionamento dos grupos sulfato nos polissacarídeos, foi realizada a reação de dessulfatação solvolítica. A partir de análises comparativas de metilação do polímero carboxirreduzido e carboxirreduzido/dessulfatado é possível identificar a posição dos grupos sulfato no polímero original, assim como das ligações glicosídicas.

Portanto, as frações Gb1-R e Gb1r-R foram submetidas à dessulfatação como previamente descrito no item 3.7.3, originando as frações carboxirreduzidas/dessulfatadas Gb1-RD (52,0% de rendimento) e Gb1r-RD (53,8% de rendimento). Na sequência, as frações foram avaliadas quanto ao teor de grupos sulfatos, sendo que a fração Gb1-RD apresentou 5,0% e a fração Gb1r-RD apresentou 4,9% destes grupos, o que corresponde a 82,9% e 83,1% de dessulfatação, respectivamente (TABELA 10).

A análise da composição monossacarídica das frações carboxirreduzidas/dessulfatadas foi semelhante à de suas correspondentes frações carboxirreduzidas, indicando que não houve degradação dos polímeros durante a reação de dessulfatação (TABELA 10). Sendo assim, as frações Gb1-R, Gb1-RD, Gb1r-R e Gb1r-RD foram submetidas a análises de metilação.

TABELA 10 – RENDIMENTOS, TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Gb1-R E Gb1r-R ANTES E APÓS DESSULFATAÇÃO

Fração	Rendimento (%)	Sulfato ^a (%)	Monossacarídeos (mol%) ^b			
			Rha	Xyl	Gal	Glc
Gb1-R ^c	88,3	29,3	64,3	8,8	10,0 (2,7)	16,9 (8,9)
Gb1-RD	52,0 ^d	5,0	65,9	7,9	9,3	16,9
Gb1r-R ^c	84,6	29,1	66,5	6,6	7,8 (2,4)	19,1 (10,7)
Gb1r-RD	52,8 ^d	4,9	64,6	4,8	7,5	23,0

FONTE: o autor (2017). ^a segundo DODGSON; PRICE (1962). ^b monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis. Os números entre parênteses correspondem à % de GalA e GlcA quantificados como 1,6,6-trideuterio galactitol hexaacetato e 1,6,6-trideuterio glucitol hexaacetato, respectivamente. ^c frações incluídas para fins comparativos. ^d em relação ao material submetido à dessulfatação.

4.3.3 Análise de metilação das frações Gb1-R, Gb1-RD, Gb1r-R e Gb1r-RD

As análises de metilação das frações Gb1 e Gb1r foram conduzidas com os polímeros previamente carboxirreduzidos Gb1-R e Gb1r-R (ver item 3.7.4). Desta forma, entre os derivados parcialmente metilados pode-se identificar e quantificar o padrão estrutural dos ácidos urônicos constituintes do polímero original. Adicionalmente, análises de metilação foram conduzidas com as heteroramnanas carboxirreduzidas e dessulfatadas (Gb1-RD e Gb1r-RD). Os resultados comparativos das análises de metilação dos polissacarídeos antes e após dessulfatação permitem a identificação dos sítios de sulfatação do polímero original.

Deste modo, utilizando estas estratégias, os tipos de ligação glicosídica e o posicionamento dos grupos sulfato presentes no polissacarídeo nativo (Gb1) e homogêneo (Gb1r) foram determinados. Previamente, as frações Gb1-R, Gb1-RD, Gb1r-R e Gb1r-RD foram dialisadas contra solução de trietilamina (3% m/v) a fim de torná-las solúveis no meio reacional (DMSO). Após permetilação, os polímeros foram derivatizados a acetatos de alditol parcialmente metilados, e analisados por GC-MS.

Os resultados encontram-se na TABELA 11. Como pode ser observado, as frações carboxirreduzidas (Gb1-R e Gb1r-R) apresentam grande variedade de derivados parcialmente metilados, demonstrando diferentes graus de substituição e a complexidade estrutural destes polissacarídeos. Em relação às unidades de

ramnose, as duas frações apresentam derivados trimetilados (2,3,4-Me-Rha), dimetilados (2,4-Me-Rha e 3,4-Me-Rha) e monometilados (2-Me-Rha, 3-Me-Rha e 4-Me-Rha). Adicionalmente, altas porcentagens de ramnose não metilada foram identificadas nas duas frações, mesmo após 3 etapas sequenciais de metilação, sugerindo a presença de ramnose 2,3,4-trissubstituída. A fim de facilitar a exposição e discussão dos resultados, as frações Gb1-R e Gb1-RD foram analisadas separadamente das frações Gb1r-R e Gb1r-RD.

TABELA 11 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES Gb1-R, Gb1-RD, Gb1r-R e Gb1r-RD

Derivado ^a	Ligação	Frações			
		Gb1-R	Gb1-RD	Gb1r-R	Gb1r-RD
2,3,4-Me-Rha ^b	Rhap-(1→	0,8	0,8	1,0	1,0
3,4-Me-Rha	→2)-Rhap-(1→	3,7	19,1	1,9	14,0
2,4-Me-Rha	→3)-Rhap-(1→	6,0	38,5	4,9	35,9
2-Me-Rha	→3,4)-Rhap-(1→	14,9	-	13,0	-
4-Me-Rha	→2,3)-Rhap-(1→	13,0	5,0	20,4	13,3
3-Me-Rha	→2,4)-Rhap-(1→	10,4	2,0	11,6	3,4
Rha	→2,3,4)-Rhap-(1→	17,8	-	16,4	-
2,3,4-Me-Xyl	Xylp-(1→	0,8	0,8	0,8	0,7
2,4-Me-Xyl	→3)-Xylp-(1→	2,9	3,2	2,4	2,7
2,3-Me-Xyl	→4)-Xylp-(1→	2,9	2,7	2,1	2,3
2,3,4,6-Me-Gal ^c	GalpA-(1→	1,0	0,8	1,8	2,1
2,3,4,6-Me-Gal	Galp-(1→	0,6	0,6	1,1	1,0
2,3,4-Me-Gal	→6)-Galp-(1→	1,4	1,5	1,1	1,4
2,6-Me-Gal	→3,4)-Galp-(1→	6,4	6,7	3,2	3,5
2,3,4,6-Me-Glc ^c	Glc pA-(1→	0,4	7,4	0,7	8,3
3,4,6-Me-Glc	→2)-Glc pA-(1→	4,5	-	5,6	-
2,3,6-Me-Glc	→4)-Glc pA-(1→	1,4	1,4	1,9	1,7
3,6-Me-Glc	→2,4)-Glc pA-(1→	2,5	-	2,0	-
2,3,4,6-Me-Glc	Glc p-(1→	1,0	0,8	1,8	2,2
2,3,6-Me-Glc	→4)-Glc p-(1→	5,2	8,3	5,0	6,5
2,3-Me-Glc	→4,6)-Glc p-(1→	2,4	-	1,3	-

FONTE: o autor (2017). - = não detectado. ^a mol% dos monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditol parcialmente metilados. ^b 2,3,4-Me-Rha analisada como 1,5-di-O-acetil-2,3,4-O-metilramnitol, etc. ^c derivados carboxirreduzidos analisados como os exemplos: 2,3,4,6-GlcA: 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideuterio)-2,3,4,6-O-metilglucitol; 2,3,4,6-GalA: 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideuterio)-2,3,4,6-O-metil galactitol.

4.3.3.1 Análise de metilação das frações Gb1-R e Gb1-RD

Dentre os produtos de metilação da fração Gb1-R a presença de unidades de ramnose dimetiladas (2,4-Me-Rha e 3,4-Me-Rha), demonstra que unidades de ramnose 3- e 2-ligadas são constituintes da heteroramnana Gb1 (6,0 e 3,7 mol%, respectivamente). Derivados monometilados (3-Me-Rha, 2-Me-Rha e 4-Me-Rha) e não metilados (Rha) foram atribuídos a unidades de ramnose 2,4-, 3,4- e 2,3-dissubstituídas (8,4, 14,9 e 13,0 mol%, respectivamente) e 2,3,4-trissubstituídas (17,8 mol%).

Xilose foi detectada principalmente como unidades 4-ligadas (2,9 mol%) e 3-ligadas (2,9 mol%) e como terminais não redutores (0,8 mol%). Adicionalmente, foi observada a presença de terminais não redutores de glucose (1,0 mol%), e unidades de glucose 4-ligadas (5,2 mol%) e 4,6-dissubstituídas (2,4 mol%). A presença de 2,3,4,6-Me-Gal, 2,3,4-Me-Gal e 2,6-Me-Gal indicam que as unidades de galactose encontram-se como terminais não redutores (0,6 mol%), unidades 6-ligadas (1,4 mol%) e 3,4-dissubstituídas (6,4 mol%), respectivamente.

Ácidos urônicos foram identificados dentre os produtos de metilação da fração Gb1-R como 2,3,4,6-Me-Glc, 3,4,6-Me-Glc, 2,3,6-Me-Glc e 3,6-Me-Glc, e são correspondentes, respectivamente, a terminais não redutores de ácido glucurônico (0,4 mol%), e unidades de ácido glucurônico 2-ligadas (4,5 mol%), 4-ligadas (1,4 mol%) e 2,4-dissubstituídas (2,5 mol%). Além disto, unidades de ácido galacturônico estão presentes como terminais não redutores (2,3,4,6-Me-Gal, 1,0 mol%).

As análises de metilação conduzidas com o polissacarídeo dessulfatado (Gb1-RD), quando comparadas com as análises da fração Gb1-R, mostraram aumento das unidades de ramnose 3- e 2-ligadas (6,0 → 38,5% e 3,7 → 19,1%, respectivamente). Este resultado demonstra que há substituição por sulfato na fração nativa Gb1-R, em diferentes posições. Adicionalmente, o desaparecimento do derivado 2-Me-Rha e a diminuição do derivado 3-Me-Rha (10,4 → 2,0 mol%), juntamente com o aumento de 2,4-Me-Rha e 3,4-Me-Rha comprovam que as unidades 3-ligadas (14,9 mol%) e 2-ligadas (8,4 mol%) são sulfatadas em C-4.

O desaparecimento do derivado ramnose após dessulfatação sugere a presença de unidades de ramnose 3- e 2-ligadas dissulfatadas no polímero nativo, bem como de pontos de ramificação sulfatados. O aumento relativo dos derivados de ramnose 3- e 2-ligados concomitantemente com o desaparecimento dos derivados

de ramnose entre os produtos de metilação da fração carboxirreduzida e dessulfatada, é condizente com a presença de 9,6 e 7,0 mol% de unidades de ramnose 2,4- e 3,4-dissulfatadas.

Após dessulfatação, a presença do derivado 4-Me-Rha na fração Gb1-RD (5,0 mol%) correspondente a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas demonstra que a heteroramnana Gb1 é ramificada. Adicionalmente, considerando que houve diminuição da percentagem do derivado 4-Me-Rha após dessulfatação (13,0 → 5,0 mol%), juntamente com o aumento da porcentagem do derivado correspondente a unidades 3-ligadas, pode-se concluir que Gb1 apresenta unidades 3-ligadas 2-sulfatadas (8,0 mol%).

Após dessulfatação da fração Gb1-R, o desaparecimento dos derivados 3,4,6- e 3,6-Me-Glc, concomitantemente com o aumento proporcional do derivado 2,3,4,6-Me-Glc (0,4 → 7,4 mol%) demonstra que as unidades de ácido glucurônico no polímero original são terminais não redutores 2- e 2,4-sulfatados na proporção de 4,5 e 2,5 mol%, respectivamente. Adicionalmente, as unidades de ácido glucurônico 4-ligadas encontram-se como unidades não sulfatadas (1,4 mol%). Ainda, as unidades de glucose 4-ligadas apresentam-se parcialmente sulfatadas em C-6 (2,4 mol%), sendo descritas pela primeira vez para heteroramnanas do gênero *Gayralia*. O ácido galacturônico encontra-se como terminal não redutor (0,8 mol%). As unidades de galactose não apresentam sulfatação e encontram-se presente como terminais não redutores (1,0 mol%), 3,4-dissubstituídas (6,7 mol%) ou 6-ligadas (1,5 mol%).

Vale destacar que a presença de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, além de unidades de galactose 3,4-dissubstituídas (5,0 e 6,7 mol%) estão de acordo com a soma da porcentagem de terminais não redutores (11,2 mol%), indicando que o polissacarídeo Gb1 apresenta aproximadamente 11,7% de pontos de ramificação.

A fim de confirmar o posicionamento dos grupos sulfato, a fração Gb1-R foi submetida a uma reação sequencial de metilação, dessulfatação e trideuteriometilação. Estes resultados foram discutidos no item 4.3.4.

4.3.3.2 Análise de metilação das frações Gb1r-R e Gb1r-RD

Os produtos de metilação da fração Gb1r-R mostraram presença de unidades de ramnose dimetilados (2,4-Me-Rha e 3,4-Me-Rha), indicando que as unidades encontram-se 3- e 2-ligadas, respectivamente (4,9 e 1,9 mol%). Derivados monometilados (3-Me-Rha, 2-Me-Rha e 4-Me-Rha) e não metilados (Rha) foram atribuídos a unidades de ramnose 2,4-, 3,4- e 2,3-dissubstituídas (11,6, 13,0 e 20,4 mol%, respectivamente) e 2,3,4-trissubstituídas (16,4 mol%).

Unidades de xilose estão presentes como terminais não redutores (0,8 mol%), 3-ligadas (2,4 mol%) e 4-ligadas (2,1 mol%). Adicionalmente, foi observada a presença de terminais não redutores de glucose (1,8 mol%), e unidades de glucose 4-ligados (5,0 mol%) e 4,6-dissubstituídas (1,3 mol%). A presença de 2,3,4,6-Me-Gal, 2,3,4-Me-Gal e 2,6-Me-Gal indicam que as unidades de galactose encontram-se como terminais não redutores (1,1 mol%), unidades 6-ligadas (1,1 mol%) e 3,4-dissubstituídas (3,2 mol%), respectivamente.

Ácidos urônicos foram identificados dentre os produtos de metilação da fração Gb1r-R como 2,3,4,6-Me-Glc, 3,4,6-Me-Glc, 2,3,6-Me-Glc e 3,6-Me-Glc, e são correspondentes, respectivamente, a terminais não redutores de ácido glucurônico (0,7 mol%), e unidades de ácido glucurônico 2-ligado (5,6 mol%), 4-ligado (1,9 mol%) e 2,4-dissubstituídas (2,0 mol%). Além disto, unidades de ácido galacturônico estão presentes como terminais não redutores (2,3,4,6-Me-Gal, 1,8 mol%).

As análises de metilação conduzidas com o polissacarídeo dessulfatado (Gb1r-RD) mostraram aumento das unidades de ramnose 3- e 2-ligadas (4,9 → 35,9% e 1,9 → 14,0%, respectivamente), indicando que há grau de substituição por sulfato na fração nativa Gb1r-R. Adicionalmente, o desaparecimento do derivado 2-Me-Rha e a diminuição do derivado 3-Me-Rha (11,6 → 3,4 mol%), juntamente com o aumento de 2,4-Me-Rha e 3,4-Me-Rha sugerem sulfatação em C-4 das unidades 3-ligadas (13,0 mol%) e 2-ligadas (8,2 mol%).

O desaparecimento do derivado ramnose após dessulfatação sugere a presença de unidades de ramnose dissulfatadas (10,3 mol% de unidades 3-ligadas sulfatadas em C-2 e C-4, e 3,7 mol% de unidades 2-ligadas sulfatadas em C-3 e C-4) no polímero nativo. Após dessulfatação, a diminuição do derivado 4-Me-Rha na fração Gb1r-RD (20,4 → 13,3 mol%) sugere a presença de unidades de ramnose 3-

ligadas sulfatadas em C-2 (7,1 mol%) (item 4.3.4). Adicionalmente, a presença de 13,3 mol% de 4-Me-Rha na fração Gb1r-RD indica a presença de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, as quais foram atribuídas a uma parte dos pontos de ramificação do polissacarídeo.

Após dessulfatação, o desaparecimento dos ácidos glucurônicos 2- e 2,4-ligados, junto com o aumento dos terminais não redutores de ácido glucurônico (0,7 → 8,3 mol%) sugere que 5,6 mol% dos terminais não redutores de ácido glucurônico são sulfatados em C-2 e 2,0 mol% são sulfatados em C-2 e C-4. Adicionalmente, as unidades de ácido glucurônico 4-ligado encontram-se como unidades não sulfatadas (1,7 mol%). Ainda, as unidades de glucose 4-ligadas apresentam-se parcialmente sulfatadas em C-6 (1,3 mol%). O ácido galacturônico encontra-se como terminal não redutor (2,1 mol%). A galactose não apresenta sulfatação e encontra-se presente como terminal não redutor (1,0 mol%), 3,4-dissubstituídas (3,5 mol%) ou 6-ligadas (1,4 mol%).

Vale destacar que a presença de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas e unidades de galactose 3,4-dissubstituídas (13,3 e 3,5 mol%) estão de acordo com a soma da porcentagem de terminais não redutores (15,3 mol%), indicando que o polissacarídeo Gb1 apresenta aproximadamente 16,8% de pontos de ramificação na estrutura.

A fim de confirmar o posicionamento dos grupos sulfato, a fração Gb1r-R foi submetida a uma reação sequencial de metilação, dessulfatação e trideuteriometilação. Estes resultados foram discutidos no item 4.3.4.

4.3.4 Análises de trideuteriometilação das frações Gb1-R e Gb1r-R

A fim de confirmar o posicionamento dos grupos sulfato, as frações Gb1-R e Gb1r-R foram submetidas à análise sequencial de metilação, dessulfatação e trideuteriometilação. Na primeira etapa de metilação, as hidroxilas livres do polímero são substituídas por grupos CH_3I ; na segunda etapa, os grupos sulfato presentes no polímero são removidos através da reação de dessulfatação solvolítica; e na terceira etapa, as hidroxilas geradas no polímero após dessulfatação, são substituídas por grupos CD_3I .

Através da análise por GC-MS da fração Gb1-R submetida a trideuteriometilação, foi possível observar que o derivado 4-Me-Rha apresentou fragmentos de massa correspondentes a presença de CH_3 (m/z 131) e CD_3 (m/z 134) em C-4, com porcentagens relativas de 76 e 24%, respectivamente. Sendo assim, foi possível determinar que dos 5,0 mol% de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas presentes entre os derivados parcialmente metilados da fração Gb1-RD, 3,8 mol% correspondem a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas não sulfatadas em C-4, e 1,2 mol% a unidades com substituição por grupos sulfato em C-4, no polímero original (TABELA 12).

O derivado 2,4-Me-Rha apresenta fragmentos de massa correspondentes a grupos CH_3 (m/z 131) e CD_3 (m/z 134) em C-4. Os fragmentos com m/z 131 poderiam corresponder a unidades de ramnose 3-ligadas não sulfatadas ou sulfatadas em C-2. Os fragmentos com m/z 134 poderiam corresponder a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-4 ou em ambos C-2 e C-4. Através do cálculo da porcentagem relativa do íon com m/z 131 (36,4%), foi possível determinar que dos 38,5 mol% de unidades de ramnose 3-ligadas (TABELA 11), 6,0 mol% corresponde a unidades 3-ligadas e 8,0 mol% corresponde a unidades 3-ligadas sulfatadas em C-2. A porcentagem relativa do íon com m/z 134 (63,6%) indica que dos 38,5 mol% de unidades de ramnose 3-ligadas, 14,9 mol% corresponde a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-4, e 9,6 mol% corresponde a unidades ramnose 3-ligada sulfatadas em C-2 e C-4.

O derivado 3,4-Me-Rha apresentou fragmentos com m/z em 115, indicando a presença de grupos CH_3 em C-3 e C-4. A partir da porcentagem relativa do íon com m/z 115 (19,4%), foi possível determinar que dos 19,1 mol% de unidades de ramnose 2-ligada (TABELA 11), 3,7 mol% não se apresentam sulfatadas. Além disso, os fragmentos com m/z 118 e 121 indicam a presença de grupos CD_3 em C-4 e ambos C-3 e C-4, respectivamente. A partir das porcentagens relativas dos íons com m/z 118 e 121 (44 e 36,6%, respectivamente), foi possível determinar que dos 19,1 mol% de unidades de ramnose 2-ligada, 8,4 mol% correspondem a unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-4, e 7,0 mol% correspondem a unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-3 e C-4 (TABELA 12).

TABELA 12 – ANÁLISE DOS DERIVADOS DE RAMNOSE OBTIDOS APÓS TRIDEUTERIOMETILAÇÃO DAS FRAÇÕES Gb1-R E Gb1r-R

Derivado ^a	Composto por ^b	Unidades correspondentes ^c	Mol%		Fragmentos de massa ^d
			Gb1-R	Gb1r-R	
4-Me-Rha	4-CH ₃ Rha	2L3R / 3L2R	3,8	10,2	131, 203, 262, 290
	4-CD ₃ Rha	2L3R4S / 3L2R4S	1,2	3,1	134, 206, 265, 293
2,4-Me-Rha	2,4-CH ₃ Rha	3L	6,0	5,0	118, 131, 187, 234, 262
	2,4-CD ₃ Rha	3L2,4S	9,6	10,3	121, 134, 193, 240, 268
	2-CD ₃ 4-CH ₃ Rha	3L2S	8,0	7,6	121, 131, 190, 237, 265
	2-CH ₃ 4-CD ₃ Rha	3L4S	14,9	13,0	118, 134, 190, 237, 265
3,4-Me-Rha	3,4-CH ₃ Rha	2L	3,7	1,8	115, 130, 131, 190
	3,4-CD ₃ Rha	2L3,4S	7,0	3,7	121, 133, 134, 193
	3-CH ₃ 4-CD ₄ Rha	2L4S	8,4	8,5	118, 130, 134, 190

FONTE: o autor (2017). / = e/ou. ^a monossacarídeos contendo grupos metil na posição indicada. ^b CH₃ = metil, CD₃ = trideuteriometil. ^c L, R e S correspondem a ligação glicosídica, ramificação e sulfatação na posição indicada, respectivamente. ^d Fragmentos observados nos acetatos de alditol parcialmente trideuteriometilados.

A partir da análise conjunta dos dados de metilação e trideuteriometilação, foi possível concluir que a fração nativa Gb1, obtida através de extração aquosa a 80°C da alga verde *G. brasiliensis*, é uma heteroramnana sulfatada e ramificada, constituída de unidades de ramnose 3-ligadas, 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas, na proporção de 1,00:0,49:0,13. A cada 12 unidades de ramnose que compõem a cadeia principal, 1 unidade corresponde a pontos de ramificação. As unidades 2- e 3-ligadas apresentam-se principalmente sulfatadas em C-4 (8,4 e 14,9%, respectivamente), ou dissulfatadas (7,0 e 9,6%, respectivamente). Adicionalmente, as unidades 3-ligadas são sulfatadas em C-2 (8,0%) ou não sulfatadas (6%). Os pontos de ramificação correspondentes a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas apresentam-se majoritariamente não sulfatados (3,8%), e em menor proporção sulfatados em C-4 (1,2%).

A fração Gb1r-R também foi submetida ao processo sequencial de metilação com CH₃I, dessulfatação e metilação com CD₃I. Após análise por CG-EM foi possível observar que o derivado 4-Me-Rha apresentou fragmentos de massa indicando a presença de CH₃ (m/z 131) e CD₃ (m/z 134) em C-4, com percentagens relativas de 76,7 e 23,3%, respectivamente. Sendo assim, foi possível determinar que dos 13,3

mol% de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, 10,2 mol% não contém grupos sulfato, e 3,1 mol% apresenta substituição por sulfato em C-4 (TABELA 12).

O derivado 2,4-Me-Rha contém fragmentos de massa indicando a presença de CH_3 (m/z 173) e CD_3 (m/z 176 e 179). Os fragmentos com m/z 173 correspondem a unidades de ramnose 3-ligadas não sulfatadas. Os fragmentos com m/z 179 correspondem a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 e C-4. Já o fragmento com m/z 176 poderiam corresponder a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 ou C-4. Através do cálculo da porcentagem relativa dos íons com m/z 173 (13,9%) e 179 (28,6%), foi possível determinar que dos 35,9 mol% de unidades de ramnose 3-ligadas (TABELA 11), 5,0 mol% corresponde a unidades 3-ligadas e 10,3 mol% corresponde a unidades 3-ligadas sulfatadas em ambos C-2 e C-4. A porcentagem relativa do íon com m/z 176 (57,5%) indica que dos 35,9 mol% de unidades de ramnose 3-ligadas, 13,0 mol% corresponde a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-4, e 7,6 mol% corresponde a unidades ramnose 3-ligada sulfatadas em C-2.

O derivado 3,4-Me-Rha apresentou fragmentos com m/z em 115, indicando a presença de grupos CH_3 em C-3 e C-4. A partir da porcentagem relativa do íon com m/z 115 (12,9%), foi possível determinar que dos 14,0 mol% de unidades de ramnose 2-ligada (TABELA 11), 1,8 mol% não se apresentam sulfatadas. Além disso, os fragmentos com m/z 118 e 121 indicam a presença de grupos CD_3 em C-4 e ambos C-3 e C-4, respectivamente. A partir das porcentagens relativas dos íons com m/z 118 e 121 (60,7 e 26,4%, respectivamente), foi possível determinar que dos 14,0 mol% de unidades de ramnose 2-ligada, 8,5 mol% correspondem a unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-4 e 3,7 mol% correspondem a unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-3 e C-4 (TABELA 12).

A partir da análise conjunta dos dados de metilação e trideuteriometilação, foi possível concluir que a fração homogênea Gb1r, purificada a partir do processo de ultrafiltração em membrana da fração Gb1, é uma heteroramnana sulfatada e ramificada, constituída de unidades de ramnose 3-ligadas, 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas, na proporção de 1,00:0,39:0,37, e a cada 5 unidades de ramnose que compõe a cadeia principal, 1 unidade corresponde a pontos de ramificação. As unidades 2- e 3-ligadas apresentam-se principalmente sulfatadas em C-4 (8,5 e 13,0%, respectivamente), ou dissulfatadas (3,7 e 10,3%, respectivamente). Adicionalmente, as unidades 3-ligadas podem apresentar sulfatação em C-2 (7,6%)

ou não apresentar sulfatação (5,0%). As unidades 2,3-dissubstituídas apresentam-se majoritariamente não sulfatadas (10,2%), e em menor proporção sulfatadas em C-4 (3,1%).

4.3.5 Análise comparativa dos resultados de metilação das frações nativa e homogênea (Gb1 e Gb1r)

A partir das análises de metilação e trideuteriometilação das heteroramnanas sulfatadas nativa (Gb1) e homogênea (Gb1r) obtidas da alga verde *G. brasiliensis*, foi possível determinar que ambas apresentam estruturas químicas muito semelhantes.

Tanto Gb1 como Gb1r são constituídas majoritariamente por unidades de ramnose 3-ligadas (38,5 e 35,9%, respectivamente, TABELA 11), das quais a maior parte é sulfatada em C-4 (14,9 e 13,0%, respectivamente) e dissulfatadas em C-2 e C-4 (9,6 e 10,3%, respectivamente). Substituições por sulfato em C-2 estão presentes em 8,0 e 7,6% das unidades de ramnose 3-ligadas de Gb1 e Gb1r, enquanto 6,0 e 5,0% destas unidades não são sulfatadas, respectivamente (TABELA 13).

Em relação às unidades de ramnose 2-ligadas, Gb1 e Gb1r apresentam-se majoritariamente sulfatadas em C-4 (8,4 e 8,5%, respectivamente), e dissulfatadas em C-3 e C-4 (7,0 e 3,7%, respectivamente). Pequena proporção destas unidades (3,7 e 1,8%, respectivamente) não apresentam sulfatação (TABELA 13).

A maior parte dos pontos de ramificação presentes em Gb1 e Gb1r não apresentam substituição por grupos sulfato (3,8 e 10,2%, respectivamente), enquanto 1,2 e 3,1% podem estar sulfatados em C-4 (TABELA 13).

A análise conjunta destes resultados demonstra que as heteroramnanas nativa e homogênea produzidas por *G. brasiliensis* apresentam estruturas químicas semelhantes, no que diz respeito aos tipos de ligação glicosídica e ao posicionamento de grupos sulfato.

Quando se compara os padrões de substituição das heteroramnanas sulfatadas produzidas por *G. brasiliensis* e *G. oxysperma* (TABELA 13, (CASSOLATO *et al.*, 2008), é possível observar que estes polímeros são

constituídos pelos mesmos tipos de ligações glicosídicas, diferindo apenas na distribuição de grupos sulfato ao longo da cadeia polissacarídica. Por exemplo, as heteroramnanas de *G. oxysperma* apresentam maior proporção de grupos sulfato substituindo o C-4 dos pontos de ramificação das unidades de ramnose (7,0%), assim como apresentam majoritariamente unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 (13,0%). Além disso, há menor proporção de unidades de ramnose 3-ligadas dissulfatadas (5%) nas heteroramnanas de *G. oxysperma* quando comparadas com as heteroramnanas de *G. brasiliensis* (~ 10%).

TABELA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PADRÕES DE SUBSTITUIÇÃO PRESENTES NAS HETERORAMNANAS SULFATADAS DE *G. brasiliensis* E *G. oxysperma*

Unidades	<i>G. brasiliensis</i>		<i>G. oxysperma</i> ^a
	Gb1	Gb1r	Go3r
2L3R / 3L2R	3,8	10,2	6,0
2L3R4S / 3L2R4S	1,2	3,1	7,0
3L	6,0	5,0	6,0
3L2,4S	9,6	10,3	5,0
3L2S	8,0	7,6	13,0
3L4S	14,9	13,0	10,0
2L	3,7	1,8	4,0
2L3,4S	7,0	3,7	3,0
2L4S	8,4	8,5	8,0

FONTE: o autor (2017). / = e/ou. L, R e S correspondem a ligação glicosídica, ramificação e sulfatação na posição indicada, respectivamente. ^a Segundo CASSOLATO *et al* (2008).

4.3.6 Análises de RMN das frações Gb1, Gb1-RD e Gb1r

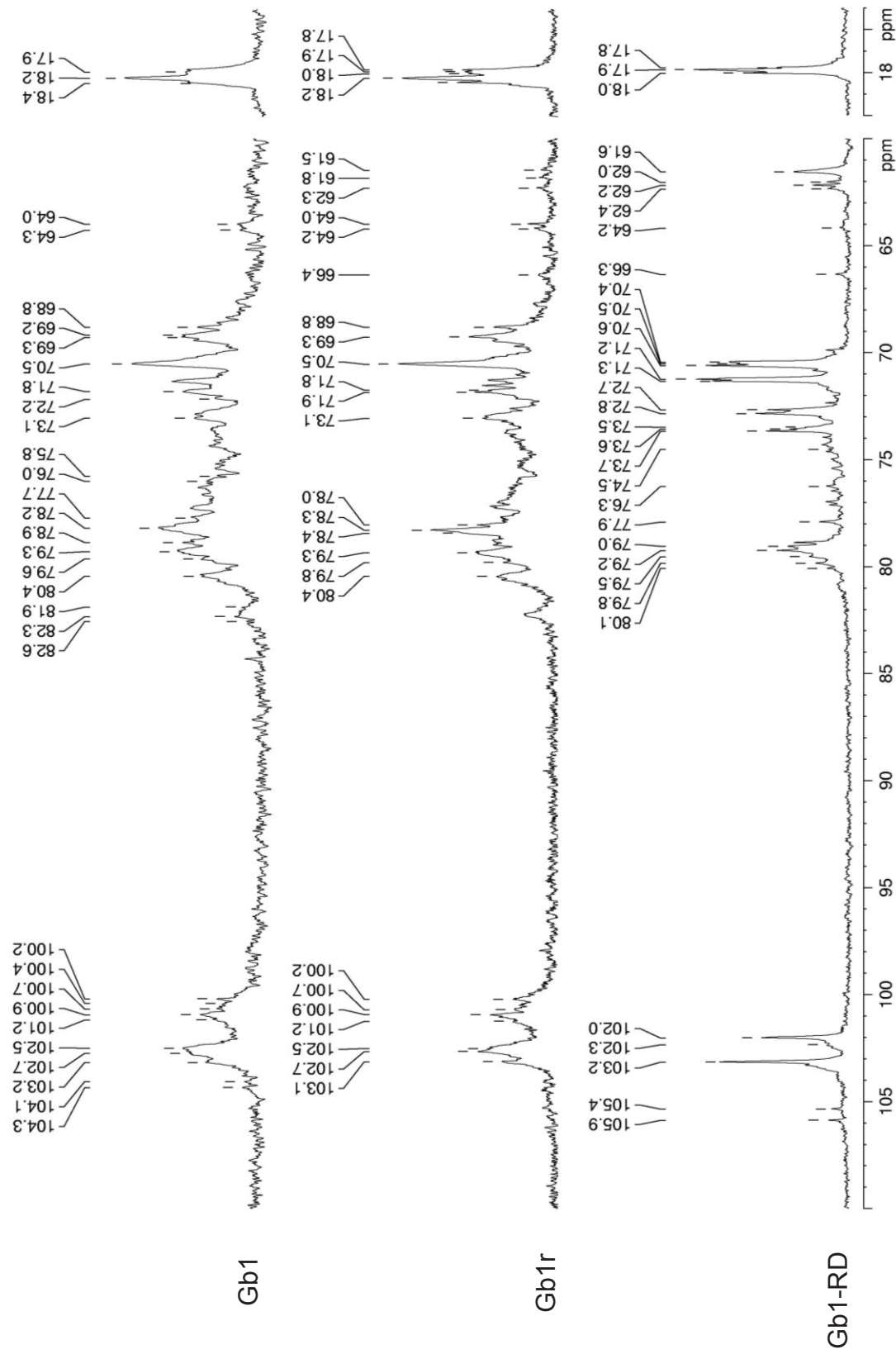
As frações Gb1, Gb1-RD e Gb1r foram analisadas por RMN uni (¹H, ¹³C e ¹³C-DEPT) e bidimensionais (HSQC, COSY, TOCSY e NOESY). Os assinalamentos foram feitos e comparados principalmente com base nos trabalhos de Cassolato *et al* (2008) e Ropellato *et al* (2015) para as heteroramnanas de *G. oxysperma*.

Os espectros de ¹³C das frações Gb1 e Gb1r apresentaram sinais alargados e sobrepostos (FIGURA 20), devido ao alto grau de sulfatação e ramificação. Como

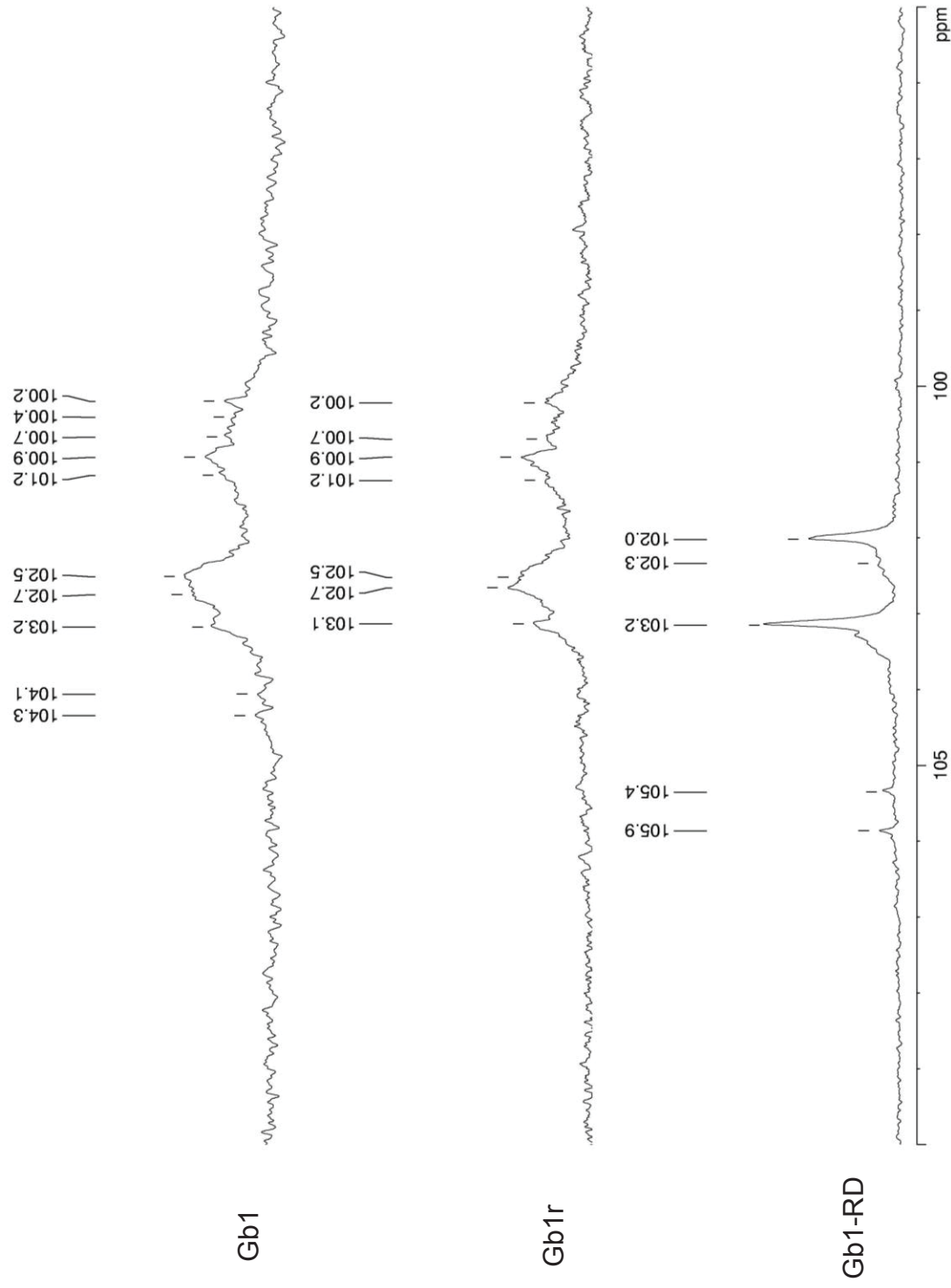
previamente discutido, os sinais anoméricos entre 103,1 e 100,2 ppm foram atribuídos às unidades de α -L-ramnose, os sinais na região entre 18,5 e 17,9 ppm foi atribuída ao C-6 de unidades de α -L-ramnose, e os sinais na região de 70,3 a 70,6 ppm correspondem ao C-5 não substituído de unidades de α -L-ramnose (FIGURAS 21 e 22).

A identificação dos ácidos urônicos e da xilose nos espectros foi dificultada não só pelo diversificado padrão de substituição e sulfatação destas unidades, mas também pela baixa quantidade desses monossacarídeos em relação à ramnose. Os sinais em 104,1 e 104,3 ppm presentes no espectro de ^{13}C da fração Gb1 foram atribuídos ao C-1 de unidades em ligação β -glicosídica, que podem corresponder a unidades de β -D-xilose ou ácidos urônicos (β -D-glucurônico e β -D-galacturônico) (FIGURA 21) (LAHAYE *et al.*, 1997; CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELLATO *et al.*, 2015).

FIGURA 20 ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD

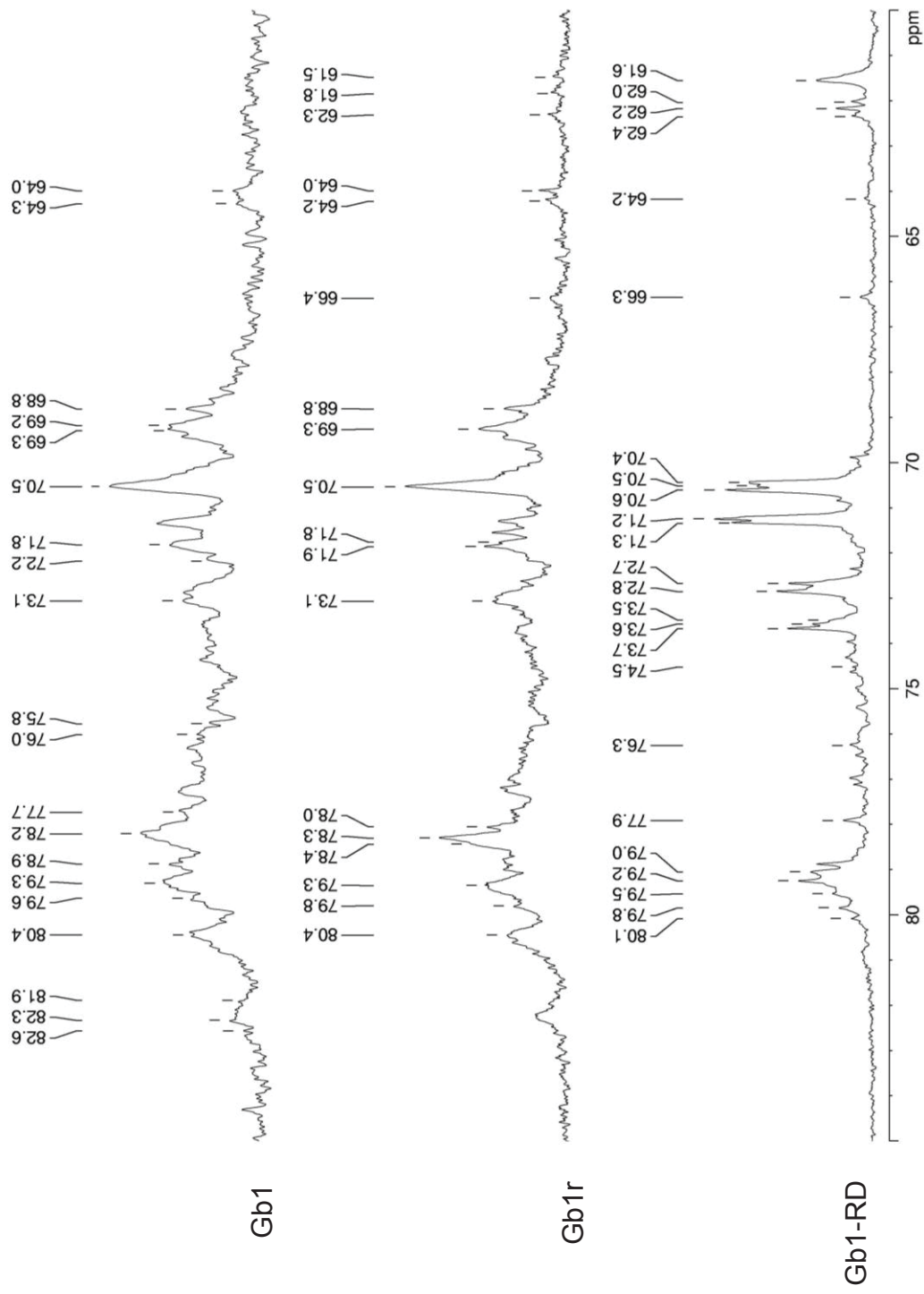


Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

FIGURA 21 REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD

Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

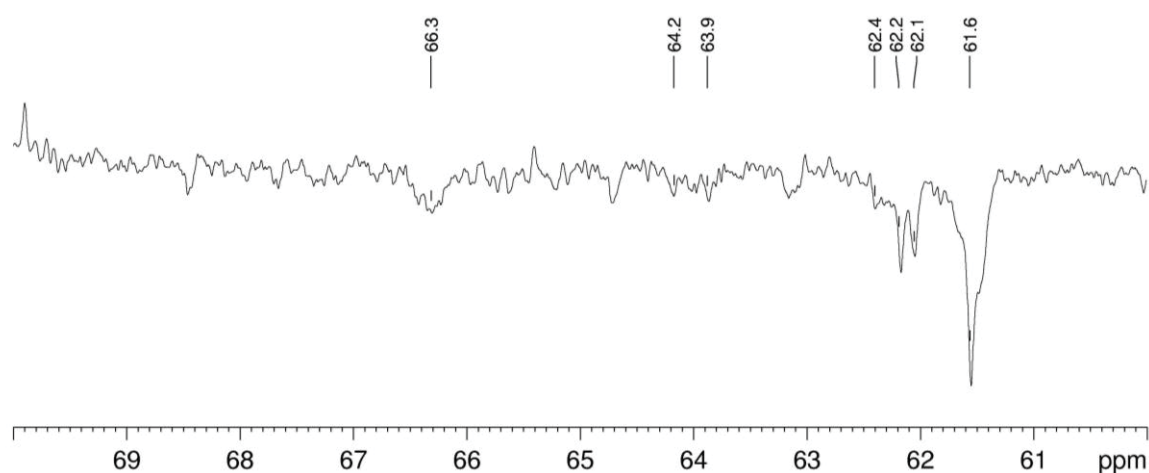
FIGURA 22 REGIÃO DOS CARBONOS DO ANEL DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD



Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

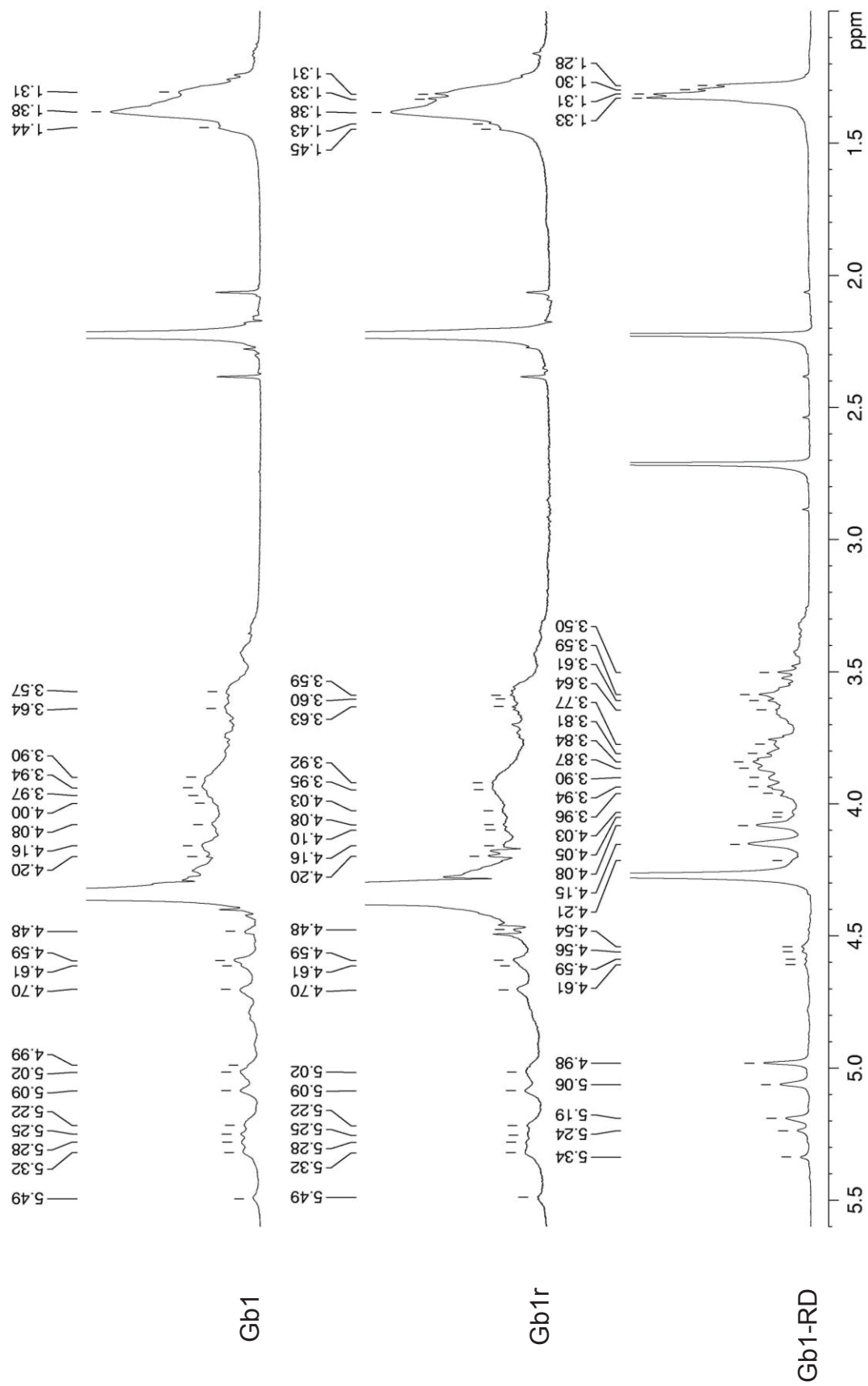
Além disto, os espectros de ^{13}C das frações Gb1r e Gb1-RD apresentaram melhor definição dos sinais na região de 61,5 a 66,4 ppm, sugerindo a presença de C-6 livre de hexoses (61,5 a 62,3 ppm), C-5 de unidades de xilose 4-ligadas (64,0 e 64,2 ppm) e C-5 de terminais não redutores de xilose (66,4 ppm) (FIGURA 22). Estes deslocamentos químicos apresentaram sinais invertidos no espectro de ^{13}C , através da análise de DEPT-135, confirmando a presença dos carbonos tipo CH_2 (FIGURA 23).

FIGURA 23 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C -DEPT DA FRAÇÃO Gb1-RD



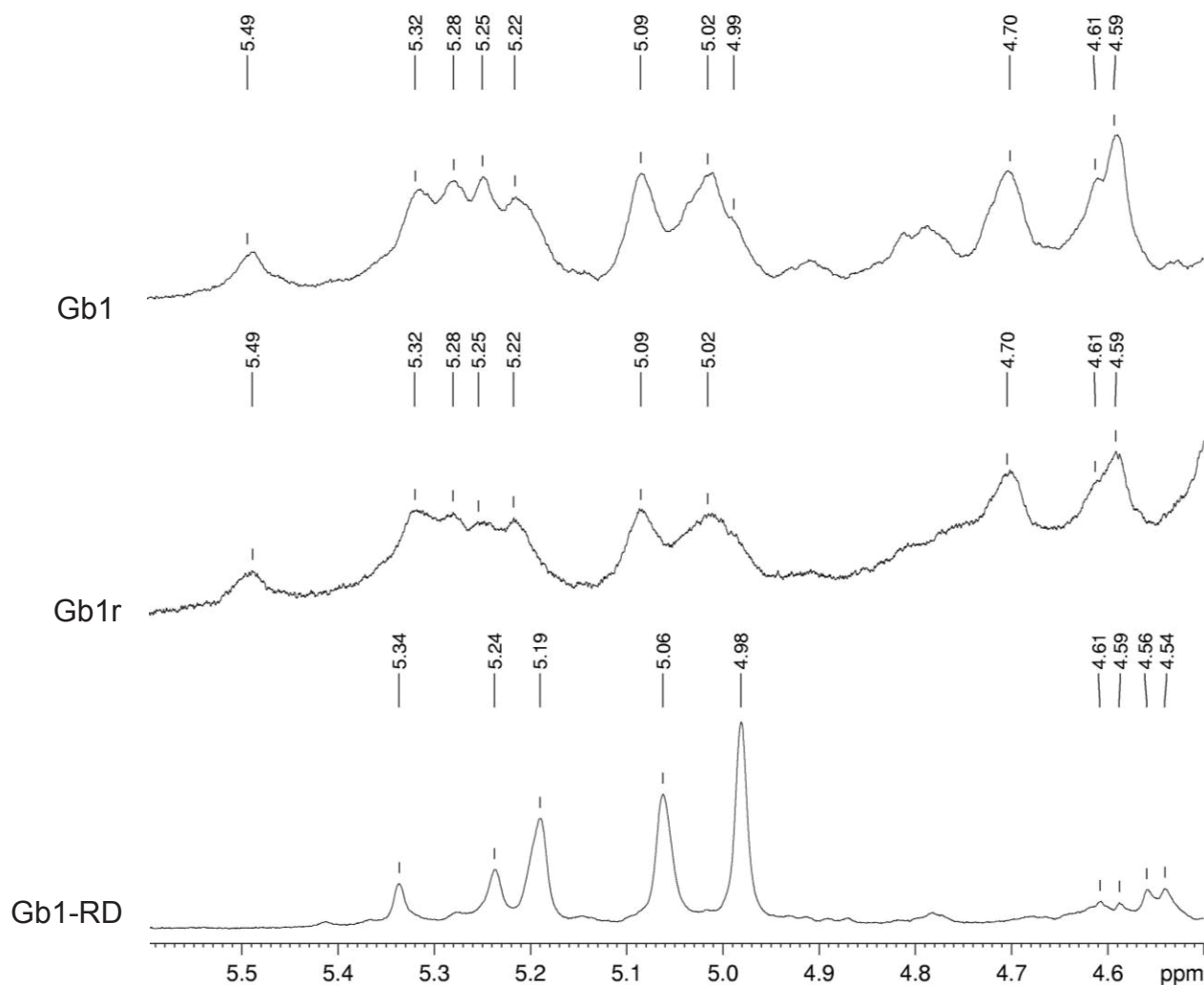
Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

Os espectros de ^1H das frações Gb1 e Gb1r são qualitativamente semelhantes (FIGURA 24). Os deslocamentos entre 4,99 e 5,49 ppm foram atribuídos às unidades de α -L-ramnose (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELLATO *et al.*, 2015).

FIGURA 24 ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD

Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 2,225 ppm.

FIGURA 25 REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r E Gb1-RD



Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 2,225 ppm.

No espectro de HSQC da fração Gb1-RD (FIGURA 28), os deslocamentos em 4,58 ($J_{1,2} = 8,1$ Hz) e 4,55 ppm ($J_{1,2} = 7,2$ Hz) correlacionam-se com os sinais em 105,4 e 105,8 ppm, respectivamente. A correlação 105,8/4,54 ppm foi atribuída ao C-1 dos terminais não redutores de β -D-glucose. Destaca-se que a heteroramnana nativa apresenta 7,4 mol% de terminais não redutores de ácido β -D-glucurônico (sulfatados em C-2 e C-2 e C-4). Considerando que o espectro de HSQC acima mencionado corresponde à fração carboxirreduzida e dessulfatada, o assinalamento em 105,8/4,54 ppm é referente às unidades de ácido β -D-glucurônico que foram carboxirreduzidos e dessulfatados originando glucose. Estes deslocamentos químicos são semelhantes aos descritos para terminais não redutores de β -D-glucose ligados ao C-2 de unidades de ramnose 3-ligadas, em O-polissacarídeos da

bactéria *Azospirillum brasiliense* (105,5/4,58 ppm) (FEDONENKO *et al.*, 2008). Portanto, no presente trabalho, os terminais não redutores de ácido β -D-glucurônico constituintes do polímero original substituem o C-2 de unidades de ramnose 3-ligadas. Adicionalmente, este resultado demonstra que pelo menos parte das cadeias laterais da heteroramnana nativa é constituída por unidades simples de ácido β -D-glucurônico. Além disto, os espectros de COSY (Anexo II, p. 196) e HSQC da fração Gb1-RD apresentam correlações H-1/H-2 em 4,54/3,36 ppm e C-2/H-2 em 74,6/3,36 ppm, respectivamente, correspondentes aos terminais não redutores de β -D-glucose (FEDONENKO *et al.*, 2008). Outras correlações H-1/H-2 em 4,58/3,36 ppm e 4,54/3,59 ppm (Anexo II, p. 196) também correspondem a outras unidades com anomeridade β .

Através de análises de HSQC realizadas com a fração Gb1 (FIGURA 26), os sinais anoméricos em 103,2/4,99 ppm foram atribuídos a unidades de ramnose 3-ligadas, e as correlações em 102,5/5,02 e 102,5-102,7/5,08 ppm correspondem às unidades 3-ligadas sulfatadas em C-4. Através das análises de HSQC, a identificação da correlação C-2/H-2 em 71,8/4,16 ppm é consistente com a presença de C-2 livre nessas unidades, e está de acordo com o que é relatado na literatura para as ramnanas de *G. oxysperma* (CASSOLATO *et al.*, 2008; ROPELLATO *et al.*, 2015). Adicionalmente, as unidades 3-ligadas sulfatadas em C-4 apresentam deslocamentos de C-3/H-3, C-4/H-4 e C-5/H-5 em 75,8-76,0/4,08-4,05, 80,4/4,34 e 68,8-69,3/3,93-3,99 ppm, respectivamente, consistente com o efeito da sulfatação em C-4 sobre C-3 (- 3 ppm), C-4 (+ 7,6 ppm) e C-5 (- 1,8 ppm) quando comparados com os deslocamentos correspondentes das unidades de ramnose 3-ligadas presentes na fração dessulfatada (Gb1-RD).

As correlações anoméricas em 100,4/5,49 e 100,9/5,32 ppm foram atribuídas às unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 e em ambos C-2 e C-4 (FIGURA 26). A correlação em 78,2/4,70 ppm, observada no espectro de HSQC, foi atribuída ao C-2/H-2 destas unidades. A presença de sulfato em C-2 foi confirmada após comparação com o assinalamento correspondente das unidades 3-ligadas na fração dessulfatada Gb1-RD, o qual aumenta de 71,3 ppm para 78,2 ppm (+6,9 ppm), de acordo com o efeito α que a sulfatação exerce sobre o carbono sulfatado (FIGURA 22). Não foi possível observar correlações H-1/H-2 nas análises de COSY e TOCSY para o sinal em 5,32 ppm, entretanto, este é semelhante ao determinado por Cassolato *et al* (2008) e Ropellato *et al* (2015) para o H-1 da unidade de

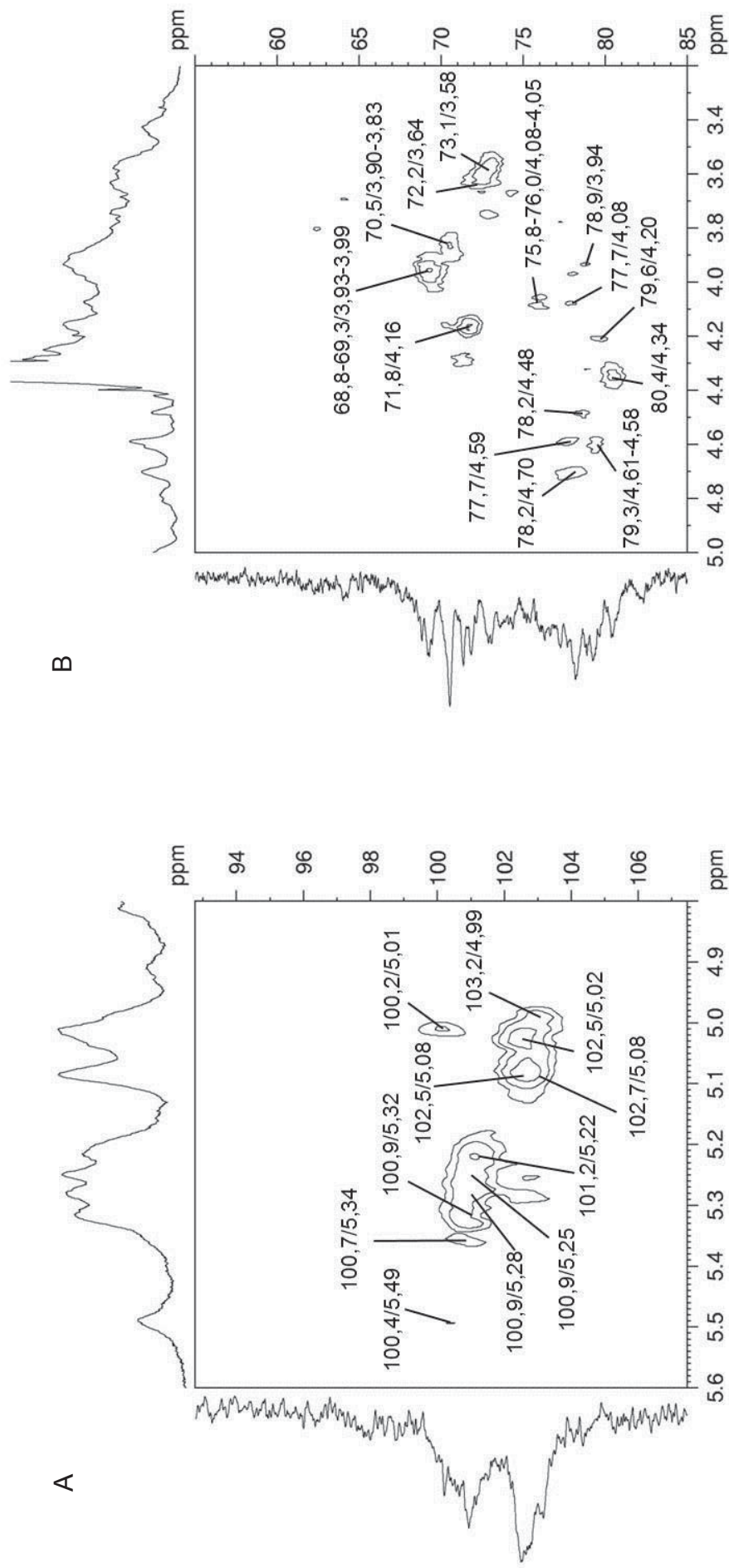
ramnose 3-ligada sulfatada em C-2 e em C-2 e C-4 de *G. oxysperma*, e desta forma, no presente trabalho o sinal em 5,32 ppm também foi atribuído a estas unidades.

Adicionalmente, os sinais correspondentes a unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-4 e em C-3 e C-4 foi observada no espectro de HSQC da fração Gb1, através das correlações anoméricas em 101,2 e 5,22 ppm (FIGURA 26). Os sinais de C-3 e C-4 em 78,2 e 79,3 ppm apresentam efeito α de 6,9 ppm e 5,7 ppm quando comparados aos sinais de unidades 2-ligadas não substituídas (fração Gb1-RD, FIGURA 22), o que está de acordo com o efeito que a sulfatação exerce sobre estes carbonos.

As correlações em 100,9/5,28 e 100,9/5,25 ppm foram atribuídas a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas. A correlação em 78,2/4,48, no espectro de HSQC, é correspondente ao C-2/H-2 destas unidades (FIGURA 26). O sinal em 79,3 ppm foi atribuído ao C-3 substituído, de forma semelhante ao observado por Ropellato *et al* (2015) para as heteroramnanas de *G. oxysperma*.

A fração Gb1r também foi analisada por RMN bidimensional de HSQC, e apresentou correlações semelhantes à fração Gb1, como pode ser observado na FIGURA 27 e na TABELA 14. Os dados de metilação juntamente com as análises de RMN, sugerem que ambas as frações apresentam estruturas químicas semelhantes e que a heterogeneidade da fração Gb1 verificada por HPSEC-MALLS reflete moléculas de diferentes massas moleculares, mas com estruturas químicas similares.

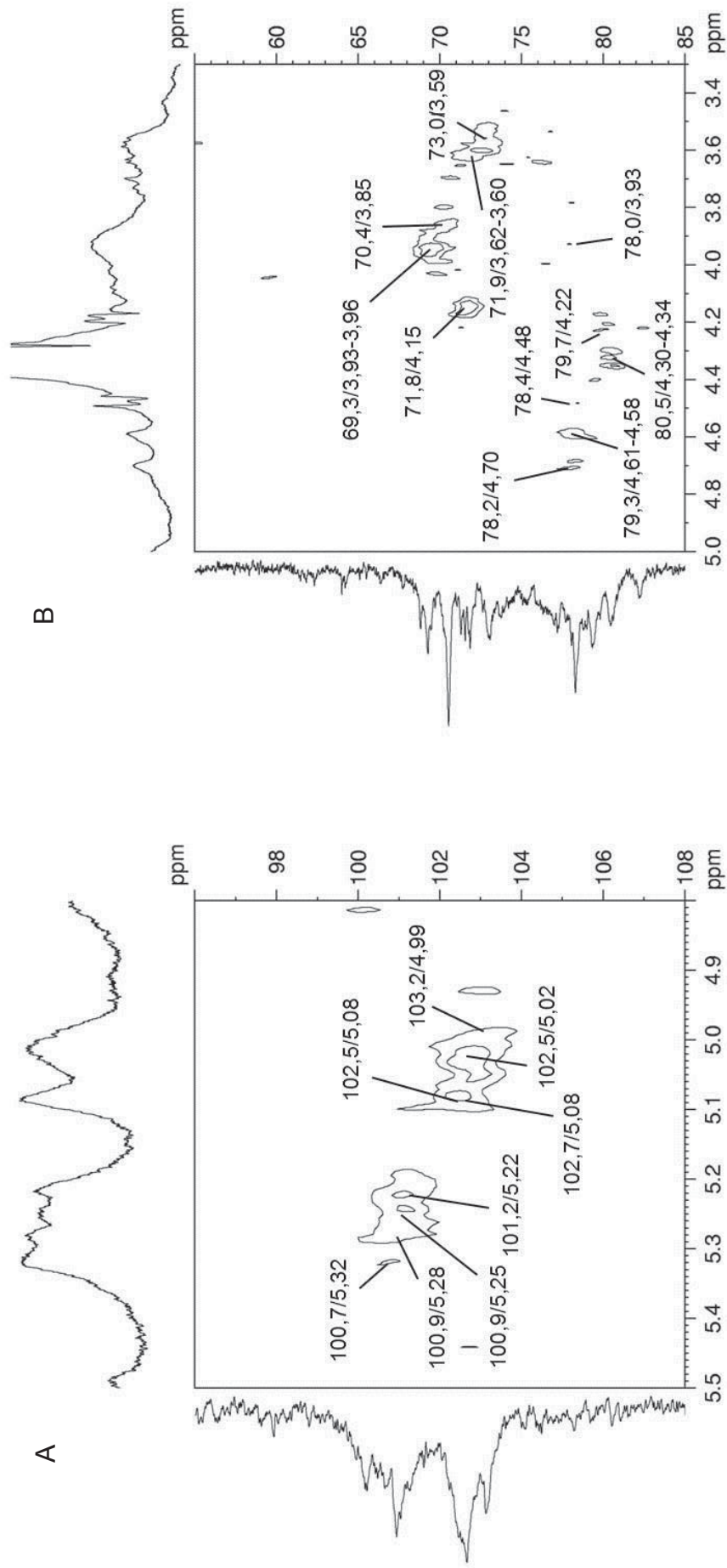
FIGURA 26 ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Gb1



Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 e 2,225 ppm.

A: Região dos carbonos do anel.

FIGURA 27 ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Gb1r



Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 e 2,225 ppm.

A: Região dos carbonos do anel. B: Região anomérica.

A heteroramnana carboxirreduzida e dessulfatada (Gb1-RD) foi analisada por RMN uni e bidimensionais. O espectro de ^{13}C desta fração apresentou dois sinais principais na região anomérica, em 103,2 e 102,0 ppm, os quais foram atribuídos a unidades de ramnose 3-ligadas e 2-ligadas, respectivamente (FIGURA 21).

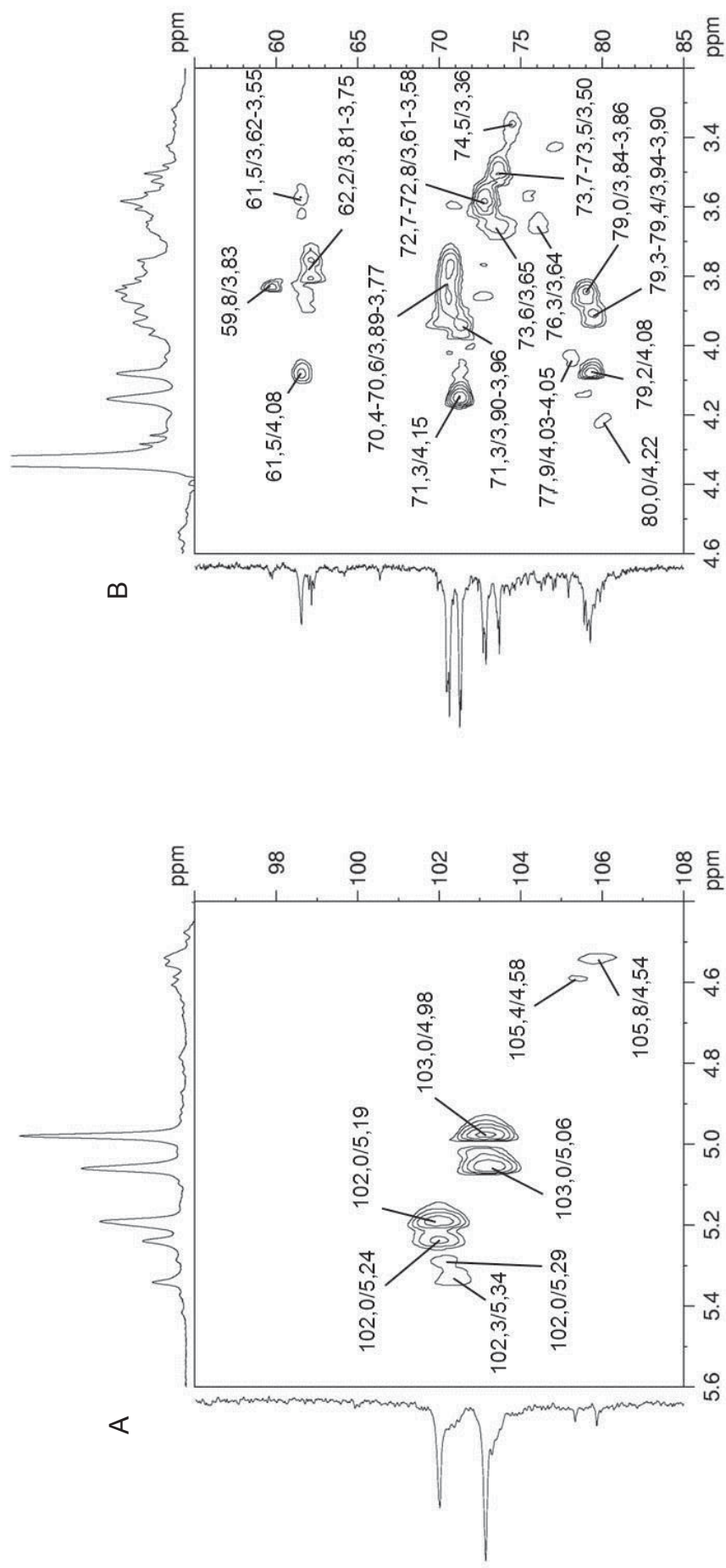
O espectro de HSQC da fração Gb1-RD (FIGURA 28) mostrou correlações em 103,2/5,06 e 103,2/4,98, correspondentes ao C-1/H-1 de unidades de ramnose 3-ligada em diferentes ambientes químicos, quando estas se encontram ligadas a outra unidade de ramnose 3-ligada ou 2-ligada, respectivamente. Adicionalmente as correlações anoméricas em 102,0/5,19 e 102,0/5,24 foram atribuídas a unidades de ramnose 2-ligada (CASSOLATO *et al.*, 2008).

As análises de COSY (Anexo II, p. 196) e TOCSY (Anexo III, p. 197) da fração Gb1-RD permitiram a identificação das correlações das unidades 3-ligadas (4,98 ppm) de H-1/H-2 e H-2/H-3 em 4,98/4,15 e 4,15/3,86-3,84 ppm (H-1/H-3 em 4,98/3,86-3,84 ppm no TOCSY), respectivamente. A mesma correlação H-1/H-2 foi observada para as unidades 3-ligadas quando estas estão ligadas a ramnose 3-ligada (H-1 em 5,06 ppm), e H-2/H-3 em 4,15/3,90-3,94 (H-1/H3 em 5,06/3,90-3,94 ppm no TOCSY). O sinal em 5,19 ppm, atribuído às unidades de ramnose 2-ligadas, apresentou correlação H-1/H-2 em 4,08 ppm, no espectro de COSY, e H-1/H-3 em 5,19/3,92 e 5,19/3,94 ppm no espectro de TOCSY. Adicionalmente, o sinal em 5,24 ppm também foi atribuído ao H-1 de unidades de ramnose 2-ligadas, em outro ambiente químico (FIGURA 28).

A correlação em 102,3/5,34 ppm que aparece no espectro de HSQC da fração Gb1-RD (FIGURA 28), foi pela primeira vez descrita para heteroramnanas sulfatadas obtidas de algas do gênero *Gayralia*. Nos espectros de COSY e TOCSY (Anexos II e III, p. 197 e 198) foram observadas correlações deste H-1 com H-2 em 4,22 ppm, o que permitiu a identificação do C-2 correspondente em 80,0 ppm no espectro de HSQC. Adicionalmente, a correlação H-2/H-3 de 4,22/4,03-4,05 ppm permitiu a identificação do C-3 correspondente no espectro de HSQC, em 77,9 ppm (FIGURA 28). Estes assinalamentos estão de acordo com os descritos por Fedonenko *et al* (2008) para unidades de ramnose 3-ligadas 2-substituídas presentes como pontos de ramificação em ramnanas extraídas da bactéria *Azospirillum brasiliense*, e portanto, no presente trabalho foram atribuídas a estas unidades.

A integração relativa dos sinais anoméricos em 5,34, 5,24, 5,19, 5,06 e 4,98 ppm no espectro de ^1H da fração Gb1-RD (FIGURA 25) mostrou uma proporção relativa de 0,15:0,26:0,67:0,78:1,00. Através do cálculo das integrais relativas a cada tipo de unidade de ramnose (1,78:0,93:0,15) para unidades 3-ligadas, 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas, respectivamente, e correção de proporção de cada unidade segundo a composição monossacarídica da fração Gb1-RD (65,9 mol% de ramnose), foi possível determinar que as heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis* apresentam 41,0% de unidades de ramnose 3-ligadas, 21,4% de unidades de ramnose 2-ligadas e 3,4% de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas. As porcentagens destas unidades, determinadas pela análise de RMN de ^1H , confirmam os resultados obtidos pela análise de metilação de Gb1-RD (38,5, 19,1 e 5 mol% de unidades de ramnose 3-ligadas, 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas, respectivamente).

FIGURA 28 ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Gb1-RD



Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 e 2,225 ppm.

A: Região dos carbonos do anel

B: Região anomérica.

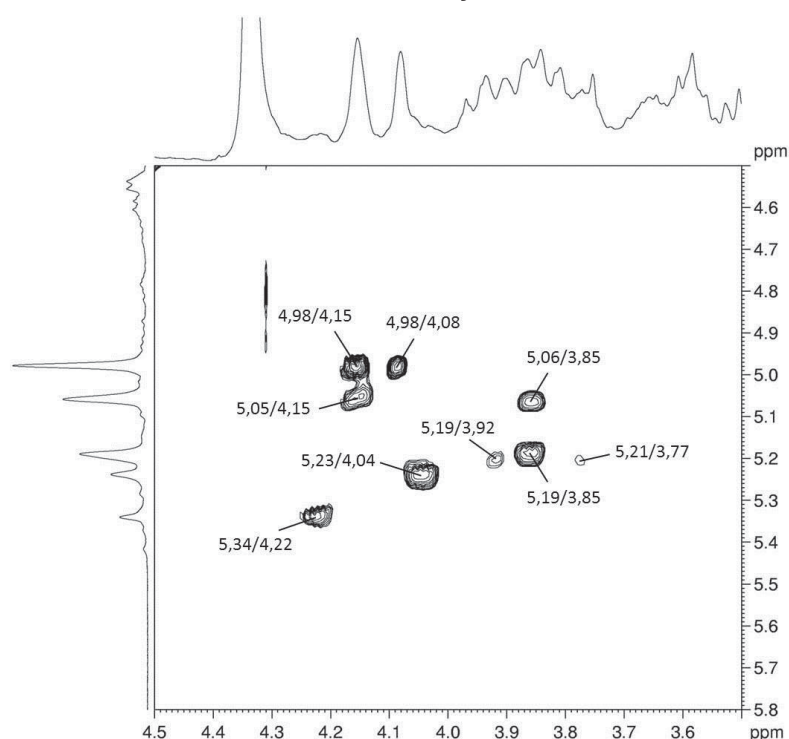
TABELA 14 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS UNI E BIDIMENSIONAIS DAS FRAÇÕES Gb1, Gb1r e Gb1-RD

Unidades de ramnose	Deslocamento químico (ppm)						Deslocamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
Gb1												
[→3)-α-L-Rhap-(1→]	103,2	71,8	78,9	72,2	-	18,4-17,9	4,98	4,16	3,94	3,64	-	1,44-1,30
[→3)-α-L-Rhap-2S-(1→]	100,9	78,2	77,7	73,1	70,5	18,4-17,9	5,32	4,70	4,08	3,58	3,90-3,83	1,44-1,30
	100,4						5,49					
[→3)-α-L-Rhap-4S-(1→]	102,5	71,8	76,0-75,8	80,4	69,3-68,8	18,4-17,9	5,08	4,16	4,08-4,05	4,34	3,99-3,93	1,44-1,30
	102,7						5,02					
[→3)-α-L-Rhap-2,4S-(1→]	100,9	78,2	76,0-75,8	80,4	69,3-68,8	18,4-17,9	5,32	4,70	4,08-4,05	4,34	3,99-3,93	1,44-1,30
	100,4						5,49					
[→2)-α-L-Rhap-4S-(1→]	101,2	79,6	-	-	69,3-68,8	18,4-17,9	5,22	4,20	-	-	3,99-3,93	1,44-1,30
[→2)-α-L-Rhap-3,4S-(1→]	101,2	77,7	78,2	79,2	69,3-68,8	18,4-17,9	5,22	4,59	4,48	4,61-4,58	3,99-3,93	1,44-1,30
[→2,3)-α-L-Rhap-(1→]	100,9	78,2	79,3	72,2	70,5	18,4-17,9	5,28/5,25	4,48	4,61-4,58	3,64	3,90-3,83	1,44-1,30
	100,7						5,34					
Gb1-RD												
[→3)-α-L-Rhap-(1→3)]	103,2	71,3	79,3	72,8-72,7	70,6-70,4	18,0-17,8	5,06	4,15	3,94-3,90	3,61-3,58	3,89-3,77	1,32-1,28
[→3)-α-L-Rhap-(1→2)]	103,2	71,3	79,0	72,8-72,7	70,6-70,4	18,0-17,8	4,98	4,15	3,86-3,84	3,61-3,58	3,89-3,77	1,32-1,28
[→2)-α-L-Rhap-(1→]	102,0	79,2	71,3	73,7-73,5	70,6-70,4	18,0-17,8	5,19	4,08	3,94-3,90	3,50	3,89-3,77	1,32-1,28
							5,24					
[→2,3)-α-L-Rhap-(1→]	102,3	80,0	77,9	73,6	70,6	18,0-17,8	5,34	4,22	4,04	3,65	3,89-3,77	1,32-1,28
Gb1r												
[→3)-α-L-Rhap-(1→]	103,2	71,8	78,0	71,9	-	18,4-17,9	4,98	4,15	3,93	3,62-3,60	-	1,42-1,28
[→3)-α-L-Rhap-2S-(1→]	100,7	78,2	-	73,0	70,4	18,4-17,9	5,32	4,70	-	3,59	3,85	1,42-1,28
[→3)-α-L-Rhap-4S-(1→]	102,5	71,8	-	80,5	69,3	18,4-17,9	5,08	4,15	-	4,34-4,30	3,96-3,93	1,42-1,28
	102,7						5,02					
[→3)-α-L-Rhap-2,4S-(1→]	100,7	78,2	-	80,5	69,3	18,4-17,9	5,32	4,70	-	4,34-4,30	3,96-3,93	1,42-1,28
[→2)-α-L-Rhap-4S-(1→]	101,2	79,7	-	-	69,3	18,4-17,9	5,22	4,22	-	-	3,96-3,93	1,42-1,28
[→2)-α-L-Rhap-3,4S-(1→]	101,2	-	78,4	79,3	69,3	18,4-17,9	5,22	-	4,48	4,61-4,58	3,96-3,93	1,42-1,28
[→2,3)-α-L-Rhap-(1→]	100,9	78,4	79,3	71,9	70,4	18,4-17,9	5,28/5,25	4,48	4,61-4,58	3,62-3,60	3,85	1,42-1,28

A correlação entre prótons anoméricos de um monossacarídeo e prótons de outro monossacarídeo espacialmente próximo pode ser determinada através da análise bidimensional de ^1H , ^1H -NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). O assinalamento prévio dos prótons dos monossacarídeos através de análises de COSY e TOCSY, aliados a esta análise, permite obter dados sobre a sequência das ligações glicosídicas no polissacarídeo (YANG; ZHANG, 2009; JONSSON, 2010).

Devido à melhor resolução dos espectros de RMN da fração Gb1-RD, esta foi analisada por NOESY (FIGURA 29).

FIGURA 29 ESPECTRO DE RMN DE NOESY DA FRAÇÃO Gb1-RD



Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 2,225 ppm.

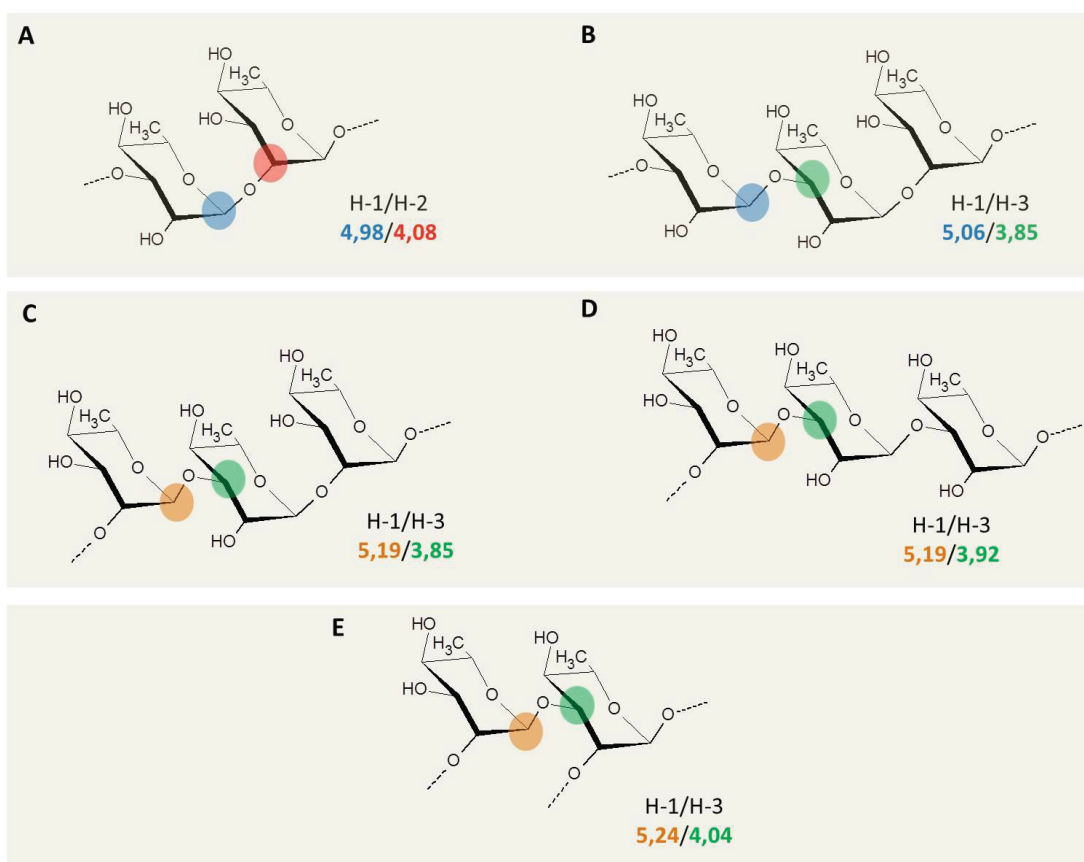
Foi possível observar correlações do H-1 das unidades de ramnose 3-ligadas (4,98 ppm) com o H-2 das unidades de ramnose 2-ligadas (4,08 ppm), sugerindo a sequência formada por unidades de ramnose 3L→2L (FIGURA 30A).

O sinal de H-1 referente às unidades de ramnose 3-ligadas (5,06 ppm) apresenta correlação com o sinal de H-3 atribuído a unidades de ramnose 3-ligadas (3,85 ppm), estando estas últimas ligadas ao C-2 de unidades de ramnose 2-ligadas. Estes dados sugerem a sequência formada por unidades de ramnose 3L→3L→2L (FIGURA 30B).

A correlação H-1/H-3 em 5,19/3,85 ppm, sugere que parte das unidades de ramnose 2-ligadas estão glicosidicamente ligadas ao C-3 de unidades de ramnose 3-ligadas, estando estas últimas ligadas ao C-2 de unidades de ramnose 2-ligadas. Estes dados sugerem a sequência formada por unidades de ramnose 2L→3L→2L, como representado na FIGURA 30C.

A correlação H-1/H-3 em 5,19/3,92 ppm sugere que as unidades de ramnose 2-ligadas estão glicosidicamente ligadas ao C-3 de unidades de ramnose 3-ligadas, estando estas últimas ligadas ao C-3 de unidades de ramnose 3-ligadas. Estes dados sugerem a sequência formada por unidades de ramnose 2L→3L→3L (FIGURA 30D). Adicionalmente, o sinal de H-1 das unidades de ramnose 2-ligadas (5,24 ppm) correlaciona-se com o sinal de H-3 de unidades de ramnose 2,3-substituídas (4,04 ppm), sugerindo que parte das unidades de ramnose 2-ligadas estão substituindo o C-3 dos pontos de ramificação (FIGURA 30E).

FIGURA 30 SUGESTÕES DE SEQUÊNCIA DAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS PRESENTES NAS HETERORAMNANAS SULFATADAS DE *G. brasiliensis*



A TABELA 15 mostra as principais correlações e possíveis sequências de ligação glicosídica propostas para as heteroramnanas de *G. brasiliensis*.

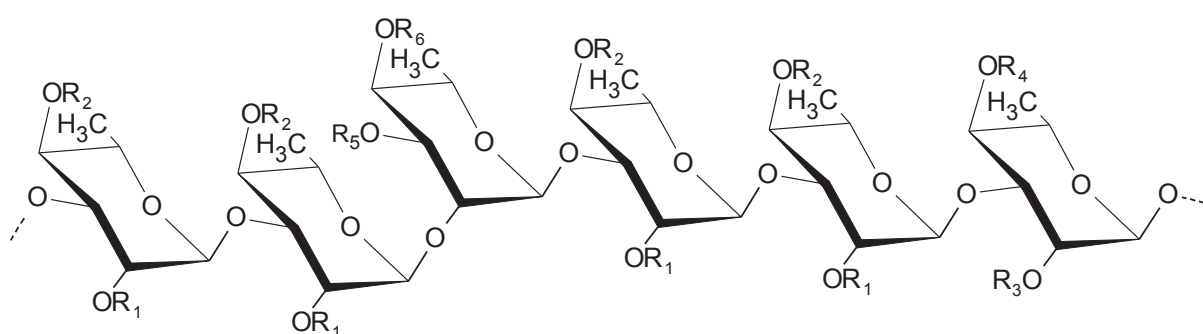
TABELA 15 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DO ESPECTRO BIDIMENSIONAL $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY DA FRAÇÃO Gb1-RD E SEQUÊNCIA DE LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS PROPOSTAS

Unidade	Correlação (ppm)		Sequência de ligação proposta
	H-1/H-2	H-1/H-3	
[$\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]	4,98/4,08	-	[$\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]
[$\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]	-	5,06/3,85	[$\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]
[$\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]	-	5,19/3,85	[$\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]
[$\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]	-	5,19/3,92	[$\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]
[$\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]	-	5,24/4,04	[$\rightarrow$ 2)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$)]
			2 ↓ R

FONTE: o autor (2017). R = cadeias laterais

O conjunto das análises de RMN das frações Gb1 e Gb1-RD confirmam os resultados de metilação, e a partir destas informações, o padrão de ligações glicosídicas e distribuição de grupos sulfato constituintes das heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis* foi determinado (FIGURA 31).

FIGURA 31 ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DAS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NAS HETERORAMNANAS SULFATADAS NATIVAS DE *G. brasiliensis*



$R_1 = R_2 = \text{H}$ (6%/5%)

$R_1 = R_2 = \text{SO}_3^-$ (9,6%/10,3%)

$R_1 = \text{H}; R_2 = \text{SO}_3^-$ (14,9%/13,0%)

$R_1 = \text{SO}_3^-; R_2 = \text{H}$ (8,0%/7,6%)

$R_3 = \text{Ponto de ramificação}$

$R_4 = \text{H}$ (3,8%/10,2%) ou SO_3^- (1,2%/3,1%)

$R_5 = R_6 = \text{H}$ (3,7%/1,8%)

$R_6 = R_6 = \text{SO}_3^-$ (7,0%/3,7%)

$R_5 = \text{H}; R_6 = \text{SO}_4^-$ (8,4%/8,5%)

As heteroramnanas sulfatadas nativas de *G. brasiliensis* são constituídas principalmente por unidades de ramnose 3-, 2- e 2,3- ligadas, as quais se encontram 39%, 44% e 24% sulfatadas em C-4, respectivamente. Além disso, aproximadamente 25% e 37% das unidades de ramnose 3- e 2-ligadas apresentam-se dissulfatadas, respectivamente, e as unidades 3-ligadas ainda podem apresentar 21% dos C-2 substituídos por sulfato. Adicionalmente, os terminais não redutores de ácido glucurônico apresentam-se 95% sulfatados, sendo 61% em C-2 e 34% em C-2 e C-4. As unidades de glucose 4-ligadas, também presentes neste polímero, apresentam-se 29% sulfatadas em C-6.

As heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis* purificadas através de ultrafiltração em membrana são constituídas por unidades de ramnose 3-, 2- e 2,3- ligadas, e apresentam 36%, 61% e 23% de grupos sulfato substituindo C-4, respectivamente. Aproximadamente 29% e 26% das unidades de ramnose 3- e 2-ligadas são dissulfatadas, respectivamente. As unidades 3-ligadas ainda apresentam 21% de sulfatação em C-2. Os terminais não redutores de ácido glucurônico são 91% sulfatados, sendo 67% sulfatados em C-2 e 24% sulfatados em C-2 e C-4. Unidades de glucose 4-ligada encontram-se sulfatadas em C-6 na proporção de 20%.

Em comparação com a estrutura das heteroramnanas de *G. oxysperma* descritas por Cassolato *et al* (2008), pode-se observar que as principais diferenças que os polissacarídeos de *G. brasiliensis* apresentam concentram-se nas proporções de grupos sulfato distribuídos ao longo do polímero. As heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* apresentam 5%, 10,3% e 13,5% de unidades 3-ligadas dissulfatadas e monossulfatadas em C-4 e em C-2, respectivamente. No presente trabalho, observa-se maior quantidade de unidades 3-ligadas dissulfatadas e sulfatadas em C-4 (9,6% e 14,9% para Gb1 e 10,3% e 13% para Gb1r, respectivamente), e menores quantidades sulfatadas em C-2 (8,0% para Gb1 e 7,6% para Gb1r). Adicionalmente, as unidades 2,3-dissubstituídas apresentam 1,2% (Gb1) e 3,1% (Gb1r) de sulfatação em C-4, enquanto as ramnanas de *G. oxysperma* apresentam 7,2%, representando aproximadamente 50% destas unidades sulfatadas em C-4. Em relação às unidades de ramnose 2-ligada das ramnanas de *G. oxysperma*, 3,3% são dissulfatadas, enquanto para os polissacarídeos nativos de *G. brasiliensis*, há maior proporção destas unidades (7,0%, Gb1).

Em relação aos ácidos urônicos, as heteroramnanas de *G. brasiliensis* apresentam maior grau de sulfatação destas unidades (95% para Gb1 e 91% para Gb1r), quando comparadas com *G. oxysperma* (80%). A presença terminais não redutores dissulfatados em C-2 e C-4 nas unidades de GlcA é uma das características estruturais diferenciais das heteroramnanas de *G. brasiliensis*. Adicionalmente, as unidades de glucose 4-ligada apresentam-se parcialmente sulfatadas em C-6, o que até então não foi descrito para heteroramnanas do gênero *Gayralia*.

Em relação às heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis*, destaca-se que tanto a fração bruta Gb1 quanto a homogênea Gb1r apresentam um padrão estrutural similar em relação aos tipos de ligações glicosídicas presentes nos polímeros e à distribuição dos grupos sulfato (ver TABELA 12). Gb1 e Gb1r são constituídas majoritariamente por unidades de ramnose 3-, 2- e 2,3-ligadas, sendo as unidades 3- e 2-ligadas majoritariamente sulfatadas em C-4 e dissulfatadas. Adicionalmente, para ambas as frações, os terminais não redutores de ácido glucurônico são majoritariamente sulfatados em C-2 ou dissulfatados em C-2 e C-4, e as unidades de glucose 4-ligadas são parcialmente sulfatadas em C-6.

A obtenção de uma fração homogênea em relação à massa molar faz parte do processo de caracterização da estrutura química fina de carboidratos. Este projeto teve como objetivos, além da determinação da estrutura química fina, modificações químicas e avaliação da atividade antitumoral das heteroramnanas nativas e quimicamente modificadas de *G. brasiliensis*. Considerando a semelhança estrutural entre a fração bruta Gb1 e a fração homogênea Gb1r, os experimentos de modificação química bem como de atividades biológicas com diferentes linhagens de células tumorais foram realizados com a fração nativa Gb1.

4.4 SULFATAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO Gb1

A fração Gb1 foi submetida à sulfatação química, através do método otimizado por (ARAÚJO *et al.*, 2013) para carragenanas obtidas de algas vermelhas. O principal objetivo da sulfatação neste trabalho foi aumentar o teor de grupos sulfato para avaliação da atividade antitumoral. Adicionalmente, a fração

quimicamente sulfatada foi caracterizada quanto à estrutura química fina, a fim de determinar o posicionamento dos grupos sulfato. Desta forma, a partir das diferenças estruturais finas entre a fração nativa Gb1 e a fração oversulfatada Gb1-OS, e do efeito citotóxico das mesmas em diferentes linhagens tumorais, buscou-se estabelecer correlações entre a estrutura e a atividade biológica.

4.4.1 Análises químicas da fração Gb1-OS

A reação de sulfatação química da fração Gb1 foi conduzida segundo Araújo *et al* (2013), na presença de dimetilformamida e trióxido de enxofre-piridina. A fração oversulfatada obtida após reação foi denominada Gb1-OS, e apresentou 89,3% de rendimento em relação à massa inicial submetida à reação (TABELA 16).

A TABELA 16 traz o rendimento e as análises químicas da fração Gb1-OS. Observou-se um aumento no teor de grupos sulfato para 55,4% quando comparado com a fração Gb1, indicando um aumento de 89% no teor destes grupos.

TABELA 16 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO Gb1-OS

Fração	Rendimento (%)	Carboidrato ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Ác. Urônico ^d (%)	Proteína ^e (%)	[α] _D ²⁰ (°)
Gb1	33	64,6	29,3	12,3	2,0	-34,2
Gb1-OS	89,3 ^a	35,8	55,4	9,0	n.d.	-21,0

FONTE: o autor (2017). ^a O rendimento foi calculado em relação à massa inicial submetida à reação de sulfatação. Determinações colorimétricas de acordo com os métodos: ^b DUBOIS *et al* (1956), ^c DODGSON e PRICE (1962), ^d FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991), e ^e LOWRY *et al* (1959).

4.4.2 Composição monossacarídica da fração Gb1-OS

A análise de composição monossacarídica foi realizada após hidrólise, redução, acetilação da fração oversulfatada, e análise por GC-MS. Os resultados foram apresentados na TABELA 17.

TABELA 17 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NA FRAÇÃO Gb1-OS

Frações	Monossacarídeos (mol%) ^a			
	Rha ^b	Xyl	Gal	Glc
Gb1	69,9	10,5	5,5	14,1
Gb1-OS	63,5	11,3	6,1	19,0

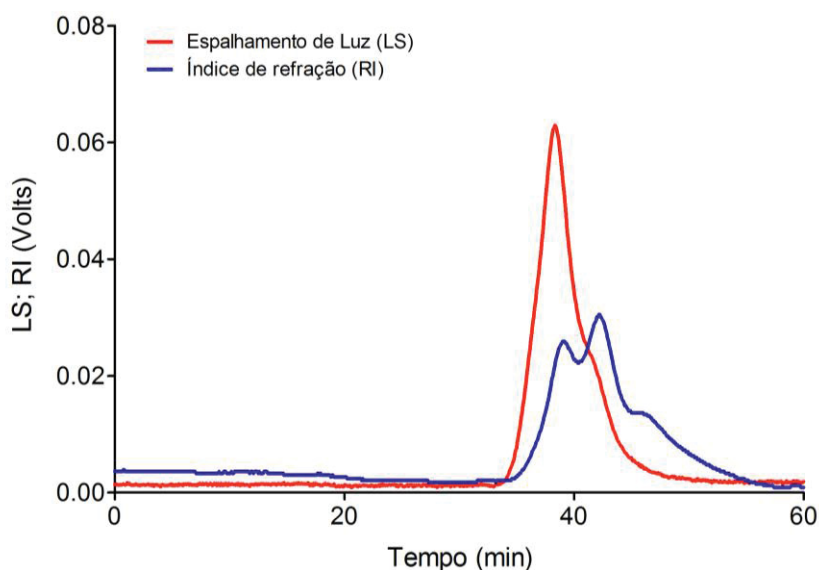
FONTE: o autor (2017). ^a Monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis. ^b abreviatura dos monossacarídeos: Rha = ramnose; Xyl = xilose; Gal = galactose; Glc = glucose.

A fração Gb1-OS apresentou composição monossacarídica semelhante à fração Gb1, sugerindo que não houve perda de unidades no polissacarídeo durante a reação de sulfatação química. No entanto, é conhecido que as reações de sulfatação frequentemente promovem despolimerização parcial, reduzindo a massa molecular do polissacarídeo modificado. Este fenômeno já foi observado para carragenanas e glucuronanas de origem bacteriana (PETIT *et al.*, 2004; PAPY-GARCIA *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2014).

4.4.3 Análise de homogeneidade da fração Gb1-OS

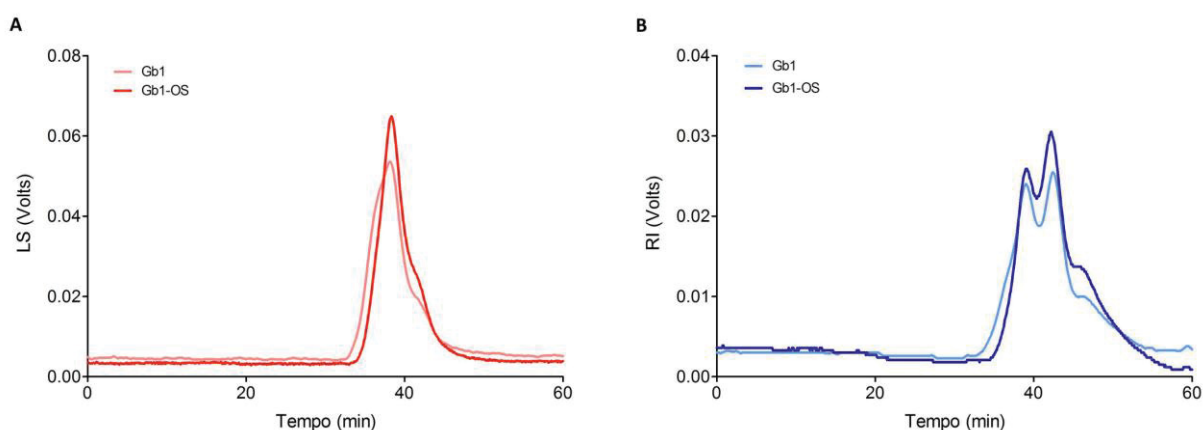
A fim de confirmar se houve ou não degradação parcial do polímero durante a reação de sulfatação química, a fração Gb1-OS foi submetida à análise de HPSEC-MALLS-RI (FIGURA 32).

FIGURA 32 CROMATOGRAMA DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO Gb1-OS



A análise de homogeneidade mostrou que a fração Gb1-OS apresenta perfil polidisperso, assim como sua fração de origem Gb1 (ver FIGURA 12A). O perfil de eluição por espalhamento de luz e por detector de índice de refração das frações Gb1 e Gb1-OS foram sobrepostos, a fim de verificar possíveis diferenças entre elas (FIGURA 33). Espera-se um aumento de massa após a sulfatação química, com mudanças no tempo de eluição em relação à fração de origem. Entretanto, neste caso a fração Gb1-OS foi eluída em tempo similar à fração Gb1, sugerindo que ambos os polímeros apresentam massas semelhantes.

FIGURA 33 CROMATOGRAMA DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-RI COMPARATIVO ENTRE Gb1 E Gb1-OS



A: cromatograma de eluição por espalhamento de luz. B: cromatograma de eluição por índice de refração.

4.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO Gb1-OS

Com o objetivo de determinar a estrutura química fina da fração Gb1-OS, no que diz respeito aos sítios de inserção de grupos sulfato, este polímero foi submetido a diferentes modificações químicas, tais como carboxirredução e metilação.

4.5.1 Carboxirredução da fração Gb1-OS

A fim de identificar e quantificar os ácidos urônicos presentes na fração Gb1-OS, foi realizada a carboxirredução na presença de carbodiimida e NaBD₄ (Taylor e Conrad, 1972), reação na qual os ácidos urônicos presentes no polissacarídeo são convertidos aos seus respectivos monossacarídeos neutros.

Após a reação de carboxirredução, não foi possível detectar a presença de ácidos urônicos na dosagem da fração Gb1-OS, indicando que houve completa redução dos ácidos urônicos a açúcares neutros (TABELA 18).

Os resultados da composição monossacarídica da fração Gb1-OS-R demonstraram aumento no conteúdo de galactose (6,1 → 9,8 mol%) e glucose (19,0 → 26,0 mol%) quando comparados com a fração original, evidenciando a presença de ácido galacturônico e glucurônico nesta fração. A análise por GC-MS mostrou aumento da porcentagem relativa dos alditóis hexaacetatos, indicando que 13,1% e 45,1% de galactitol e glucitol hexaacetatos correspondem a 1,6,6-trideutero-galactitol e 1,6,6-trideutero-glucitol hexaacetatos, respectivamente. Portanto, dos 9,8 mol% de galactose, 1,3 mol% correspondem a ácido galacturônico, e dos 26 mol% de glucose, 11,7 mol% correspondem a ácido glucurônico (TABELA 18).

TABELA 18 – RENDIMENTOS, TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS APÓS CARBOXIRREDUÇÃO

Fração	Rendimento (%)	Ácido urônico ^a (%)	Monossacarídeos (mol%) ^b			
			Rha	Xyl	Gal	Glc
Gb1 ^c	33	12,3	69,9	10,5	5,5	14,1
Gb1-R	88,3 ^d	2,0	64,3	8,8	10,0 (2,7)	16,9 (8,9)
Gb1-OS ^c	89,3	9,0	63,6	11,3	6,1	19,0
Gb1-OS-R	94,9 ^d	-	53,4	10,8	9,8 (1,3)	26,0 (11,7)

FONTE: o autor (2017). - não detectado. ^a segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). ^b monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis. Os números entre parênteses correspondem à % de GalA e GlcA quantificados como 1,6,6-trideutério galactitol hexaacetato e 1,6,6-trideutério glucitol hexaacetato, respectivamente. ^c frações incluídas para fins comparativos. ^d em relação ao material submetido a carboxirredução.

4.5.2 Análise de metilação da fração Gb1-OS

Os tipos de ligação glicosídica e o posicionamento dos grupos sulfato na fração Gb1 após ser submetida à oversulfatação (Gb1-OS-R) foram determinados através da análise de metilação (CIUCANU; KERREK, 1984). Para isto, a fração Gb1-OS-R foi dialisada contra solução de trietilamina (3% m/v) a fim de torná-la solúvel no meio reacional (DMSO). Após metilação, o polímero foi derivatizado a acetatos de alditol parcialmente metilados, e analisado por GC-MS.

Os resultados encontram-se na TABELA 19. Como esperado, a fração Gb1-OS-R apresentou um aumento dos derivados não metilados ramnose (16,5 para 41,7 mol%), assim como foi observado o aparecimento dos derivados não metilados xilose (2,8 mol%), galactose (4,1 mol%) e glucose (9,1 mol%), sugerindo que houve alto grau de substituição por sulfato após reação de oversulfatação.

Após a análise de trideuteriometilação da fração nativa Gb1-R (TABELA 12), foi possível rastrear quantitativamente o posicionamento original dos grupos sulfato entre as diferentes unidades de ramnose 3-ligada, 2-ligada e 2,3-dissubstituída. A partir destas informações, o grau de substituição por grupos sulfato (DS) nas unidades de ramnose do polímero nativo foi calculado em 0,95. Após a reação de oversulfatação, espera-se que todas as hidroxilas livres passíveis de sulfatação sejam substituídas. Levando em consideração que o polímero nativo já apresenta unidades naturalmente sulfatadas, o DS máximo calculado caso todas as hidroxilas livres restantes fossem substituídas, seria 1,86.

Através da análise da TABELA 19, foi possível observar, na fração Gb1-OS-R, a diminuição da proporção de 2,3,4-Me-Rha (0,8 para 0 mol%), 3,4-Me-Rha (3,7 para 0,9 mol%), 2,4-Me-Rha (6,0 para 1,8 mol%), 2-Me-Rha (14,9 para 5,5 mol%), 4-Me-Rha (11,8 para 8,3 mol%) e 3-Me-Rha (8,4 para 2,6 mol%). Estes resultados sugerem que uma pequena proporção das unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-4 (5,5 mol%), 2-ligadas sulfatadas em C-4 (2,6 mol%), 3-ligadas (1,8 mol%) e 2-ligadas (0,9 mol%) não tiveram grupos sulfato inseridos nas hidroxilas livres após oversulfatação.

Vale destacar que 9,6 mol%, 7,0 mol% e 1,2 mol% das unidades de ramnose 3-ligada 2,4-dissulfatadas, 2-ligada 3,4-dissulfatadas e 2,3-dissubstituídas sulfatadas em C-4, respectivamente, presentes no polímero nativo Gb1-R, já estão contidas

nos 41,7 mol% do derivado ramnose observado em Gb1-OS-R. Dos 23,9 mol% restantes, 9,4 mol% corresponde às unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-4 que foram sulfatadas quimicamente em C-2, e 5,8 mol% corresponde às unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-4 que foram sulfatadas quimicamente em C-3. Adicionalmente, 0,8 mol% dos terminais não redutores de ramnose foram substituídos em C-2, C-3 e C-4, e 2,8 mol% e 4,2 mol% das unidades de ramnose 2-ligadas e 3-ligadas foram substituídas em C-3/C-4, e C-2/C-4, respectivamente. A partir destas informações, o DS do polissacarídeo oversulfatado foi calculado em 1,90, semelhante ao valor teórico calculado em 1,86.

O desaparecimento do derivado 2,3,4-Me-Xyl, e a diminuição de 2,4-Me-Xyl (3,2 para 1,5 mol%) e 2,3-Me-Xyl (2,7 para 1,0 mol%), juntamente com o aparecimento de xilose não metilada (4,1 mol%) sugere que 0,8 mol% dos terminais não redutores de xilose foram sulfatados em C-2, C-3 e C-4, 1,7 mol% das unidades de xilose 3-ligada foram substituídas por sulfato em C-2 e C-4, e 1,7 mol% das unidades de xilose 4-ligada foram substituídas por sulfato em C-3 e C-4. A diminuição de 2,6-Me-Gal (6,7 para 1,9 mol%), juntamente com o aparecimento de galactose (4,1 mol%) sugere sulfatação em C-2 e C-6 das unidades de galactose 3,4-ligadas. Os terminais não redutores de ácido galacturônico, galactose e as unidades de galactose 6-ligadas não foram sulfatados. Adicionalmente, em relação às unidades de ácido glucurônico pode-se observar que não houve variação na proporção dos derivados metilados após sulfatação química. Isto foi observado para os terminais não redutores não sulfatados ou naturalmente sulfatados em C-2 e ambos C-2 e C-4, assim como para as unidades de ácido glucurônico 4-ligadas, sugerindo que estas unidades não apresentaram sítios disponíveis para entrada de sulfato.

A diminuição dos derivados 2,3,4,6-Me-Glc (1,0 para 0,3 mol%), 2,3,6-Me-Glc (5,2 para 2,2 mol%) e 2,3-Me-Glc (2,4 para 0,5 mol%), juntamente com o aparecimento de glucose não metilada (9,1 mol%), sugerem que houve sulfatação de parte dos terminais não redutores de glucose (0,7 mol%) em C-2, C-3, C-4 e C-6, assim como parte das unidades de glucose 4-ligadas (3,0 mol%) foram sulfatadas em C-2, C-3 e C-6, e parte das unidades de glucose 4-ligadas naturalmente sulfatadas em C-6 foram quimicamente sulfatadas em C-2 e C-3 (1,9 mol%).

TABELA 19 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO Gb1-OS-R

Derivado ^a	Padrão de substituição ^d	Gb1-R (mol%)	Padrão de substituição	Gb1-OS-R (mol%)
2,3,4-Me-Rha ^b	Rhap-(1→	0,8	Rhap-(1→	-
3,4-Me-Rha	→2)-Rhap-(1→	3,7	→2)-Rhap-(1→	0,9
2,4-Me-Rha	→3)-Rhap-(1→	6,0	→3)-Rhap-(1→	1,8
2-Me-Rha	→3)-Rhap-4S-(1→	14,9	→3)-Rhap-4S-(1→	5,5
4-Me-Rha	→2,3)-Rhap-(1→	3,8	→2,3)-Rhap-(1→	8,3
	→3)-Rhap-2S-(1→	8,0		
3-Me-Rha	→2)-Rhap-4S-(1→	8,4	→2)-Rhap-4S-(1→	2,6
Rha	→3)-Rhap-2,4S-(1→	9,6	→2,3,4)-Rhap-(1→	41,7
	→2)-Rhap-3,4S-(1→	7,0		
	→2,3)-Rhap-4S-(1→	1,2		
2,3,4-Me-Xyl	Xylp-(1→	0,8	Xylp-(1→	-
2,4-Me-Xyl	→3)-Xylp-(1→	3,2	→3)-Xylp-(1→	1,5
2,3-Me-Xyl	→4)-Xylp-(1→	2,7	→4)-Xylp-(1→	1,0
Xyl	→2,3,4)-Xylp-(1→	-	→2,3,4)-Xylp-(1→	4,1
2,3,4,6-Me-Gal ^c	GalpA-(1→	1,0	GalpA-(1→	2,3
2,3,4,6-Me-Gal	Galp-(1→	0,6	Galp-(1→	1,2
2,3,4-Me-Gal	→6)-Galp-(1→	1,5	→6)-Galp-(1→	2,0
2,6-Me-Gal	→3,4)-Galp-(1→	6,7	→3,4)-Galp-(1→	1,9
Gal	→2,3,4,6)-Galp-(1→	-	→3,4)-Galp-2,6S-(1→	4,1
2,3,4,6-Me-Glc ^c	Glc pA-(1→	0,4	Glc pA-(1→	0,2
3,4,6-Me-Glc	Glc pA-2S-(1→	4,5	Glc pA-2S-(1→	4,8
2,3,6-Me-Glc	→4)-Glc pA-(1→	1,4	→4)-Glc pA-(1→	1,7
3,6-Me-Glc	Glc pA-2,4S-(1→	2,5	Glc pA-2,4S-(1→	2,3
2,3,4,6-Me-Glc	Glc p-(1→	1,0	Glc p-(1→	0,3
2,3,6-Me-Glc	→4)-Glc p-(1→	5,2	→4)-Glc p-(1→	2,2
2,3-Me-Glc	→4)-Glc p-6S-(1→	2,4	→4)-Glc p-6S-(1→	0,5
Glc	→2,3,4,6)-Glc p-(1→	-	Glc p-2,3,4,6S-(1→	9,1
			→4)-Glc p-2,3,6S-(1→	

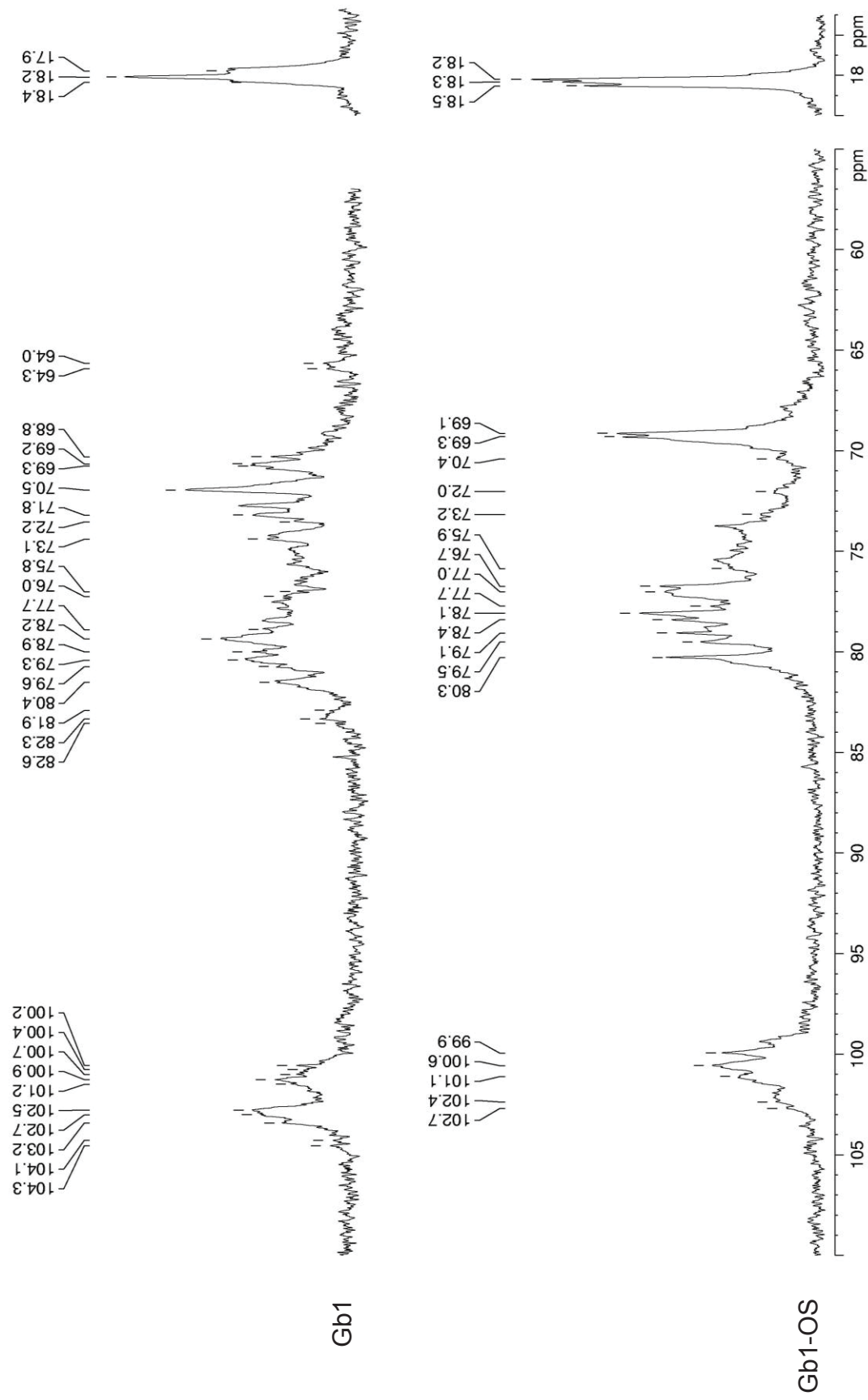
FONTE: o autor (2017). - = não detectado. ^a mol% dos monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditol parcialmente metilados. ^b 2,3,4-Me-Rha analisada como 1,5-di-O-acetil-2,3,4-O-metilramnitol, etc. ^c derivados carboxirreduzidos analisados como os exemplos: 2,3,4,6-GlcA: 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideuterio)-2,3,4,6-O-metil glucitol; 2,3,4,6-GalA: 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideuterio)-2,3,4,6-O-metil galactitol. ^d derivados carboxirreduzidos da fração nativa, analisados por trideuteriometilação (TABELA 12).

Estes resultados sugerem que a reação de sulfatação química foi eficaz para obtenção de uma heteroramnana com alto grau de sulfatação, sendo que o padrão de ligações glicosídicas do polímero oversulfatado não difere do padrão observado em Gb1. Desta forma, a heteroramnana oversulfatada foi utilizada para realização dos testes biológicos para avaliação do potencial antitumoral. Vale ressaltar que este é o primeiro trabalho que descreve a sulfatação química em polissacarídeos de algas verdes.

4.5.3 Análises de RMN da fração Gb1-OS

A fim de confirmar os resultados obtidos pela análise de metilação, a fração Gb1-OS foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C e HSQC, em comparação com a fração Gb1. A FIGURA 34 mostra os espectros de ^{13}C completos das frações Gb1 e Gb1-OS, e a FIGURA 35 mostra a ampliação da região anomérica destas frações. É possível observar diferenças de intensidade de sinais após a oversulfatação. Por exemplo, o sinal em 103,2 ppm que foi descrito em Gb1 como C-1 de unidades de ramnose 3-ligada não aparece no espectro da fração Gb1-OS, assim como há diminuição da intensidade dos sinais em 102,5 e 102,7 ppm, referentes ao C-1 de unidades de ramnose 3-ligada sulfatada em C-4. Além disto, observa-se um aumento da intensidade de sinais na região entre 101,1 e 100,6 ppm, os quais são atribuídos às unidades de ramnose 3-ligadas 2,4-dissulfatadas e 2-ligadas 3,4-dissulfatadas.

Adicionalmente, o sinal em 70,5 ppm, referente ao C-5 de unidades 3-ligadas sulfatadas em C-2 e de unidades 2,3-dissubstituídas apresenta menor intensidade quando comparado ao espectro de Gb1, o que pode ser observado juntamente com o aumento de intensidade dos sinais entre 69,1 e 69,3 ppm referentes ao C-5 de unidades de ramnose dissulfatadas ou monossulfatadas (FIGURAS 34 e 36).

FIGURA 34 ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS

Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

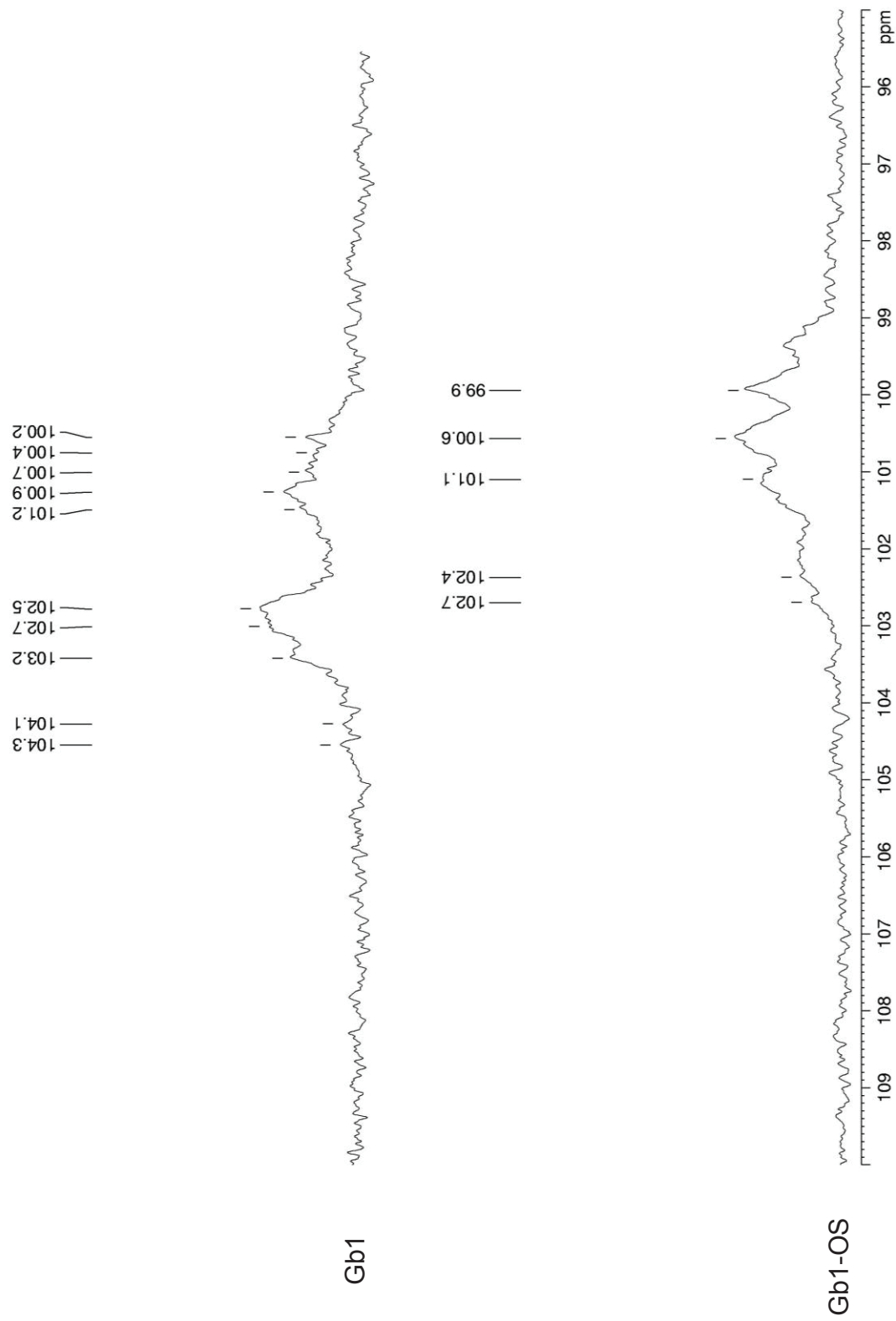
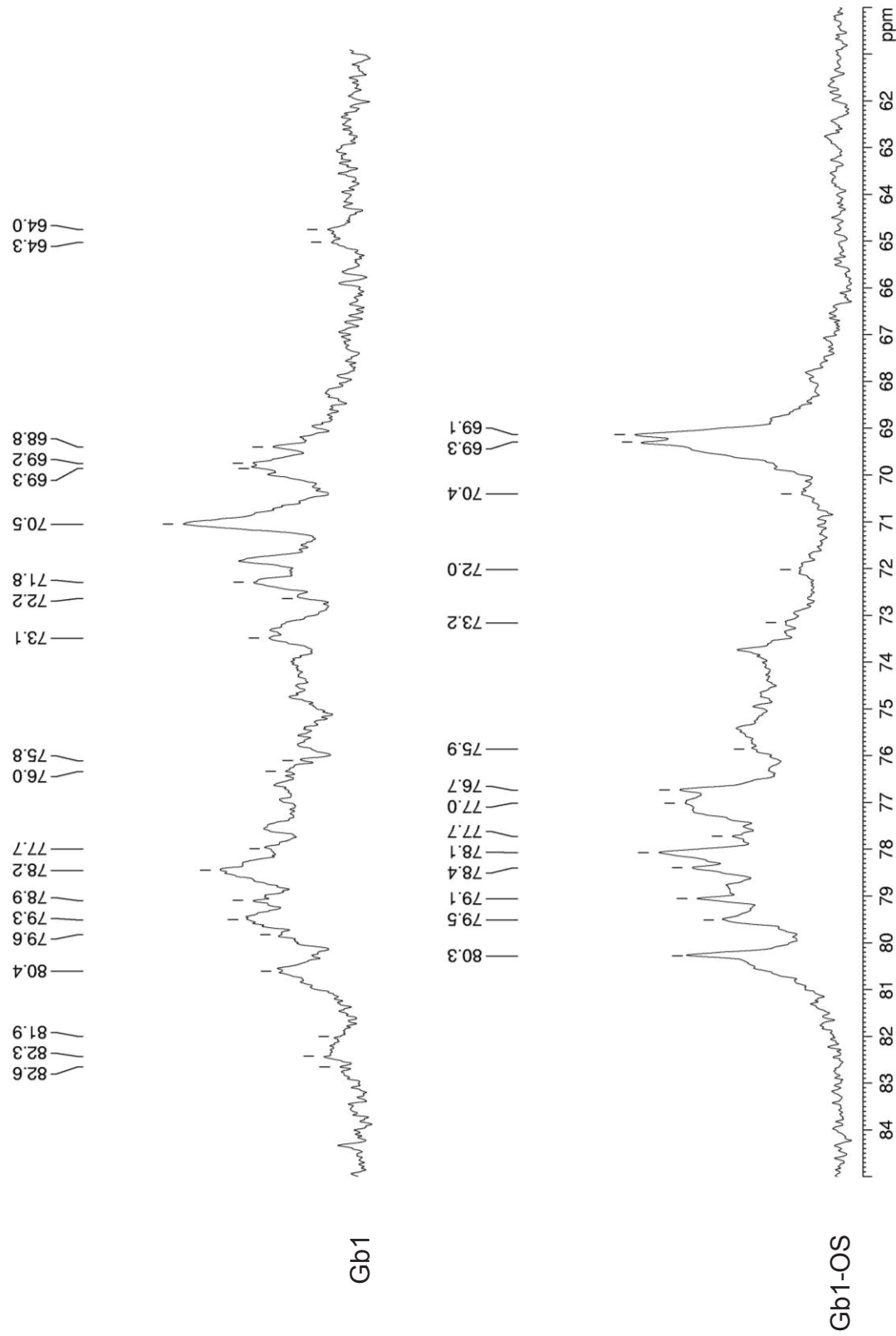
FIGURA 35 REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS

FIGURA 36 REGIÃO DOS CARBONOS DO ANEL DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS



Através de análises de HSQC da fração Gb1-OS (FIGURA 38, TABELA 20), e levando em consideração os efeitos α e β de sulfatação, a correlação anomérica em 100,6 e 5,34/5,37 ppm foi atribuída a unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 e C-4. A correlação em 101,1 e 5,21 ppm foi atribuída às unidades de ramnose 2-ligadas sulfatadas em C-3 e C-4 ou apenas C-4.

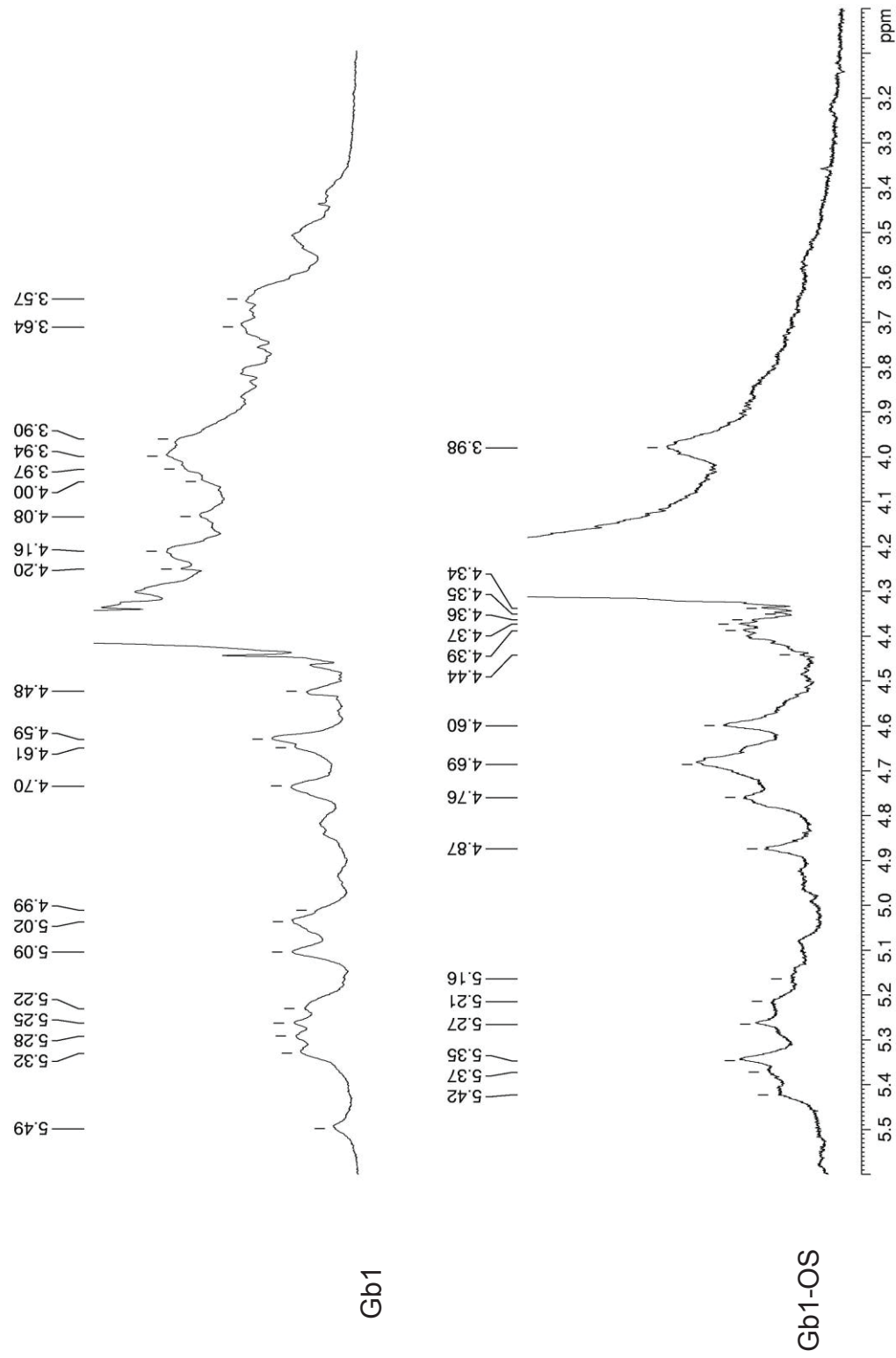
Em relação às unidades de ramnose 3-ligadas, foi possível observar no espectro de ^{13}C da fração Gb1-OS, o aumento da intensidade dos sinais referentes aos C-2 sulfatado em 78,1 (H-2 em 4,69 ppm, FIGURAS 36 e 37) e C-4 sulfatado em 80,3 ppm (H-4 em 4,31-4,34 ppm, FIGURAS 37 e 38), quando comparados com o espectro da fração Gb1 (FIGURA 36). Concomitantemente, o desaparecimento do sinal em 71,3 ppm, correspondente ao C-2 de unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-4, e a diminuição da intensidade do sinal em 73,1 ppm, correspondente ao C-4 de unidades de ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2, demonstra que as unidades 3-ligadas monossulfatadas presentes originalmente na fração Gb1 foram eficientemente dissulfatadas. Adicionalmente, o sinal de C-3 das unidades de ramnose 3-ligadas dissulfatadas, em 75,9 ppm (H-3 em 4,20 ppm), sofre influência do efeito β de sulfatação exercido em C-3 pelos grupos sulfato presentes em C-2 (-1,8 ppm) (FIGURAS 36, 37 e 38). Estes dados demonstram que a fração Gb1-OS apresentou-se rica em unidades de ramnose 3-ligadas dissulfatadas.

Foi possível observar no espectro de ^{13}C da fração Gb1-OS (FIGURA 36), o desaparecimento dos sinais na região entre 81,9 e 82,6 ppm, referentes ao C-4 sulfatado de unidades de ramnose 2-ligadas monossulfatadas. Paralelamente, houve aumento da intensidade dos sinais referentes às unidades de ramnose 2-ligadas dissulfatadas, em 78,4 (C-3) e 79,1-79,5 ppm (C-4), as quais correlacionam-se no espectro de HSQC com os sinais de H-3 em 4,44 ppm e H-4 em 4,40-4,36, respectivamente (FIGURAS 37 e 38). Adicionalmente, a intensidade do sinal correspondente ao C-2 de unidades de ramnose 2-ligadas dissulfatadas, em 76,7-77,0 ppm, aumenta no espectro de ^{13}C da fração Gb1-OS quando comparado com o espectro da fração Gb1, demonstrando que a fração Gb1-OS é mais rica em unidades 2-ligadas dissulfatadas (FIGURA 36).

A partir das análises de RMN uni e bidimensionais da fração Gb1-OS, pode-se concluir que o polímero oversulfatado apresentou sinais majoritariamente referentes a unidades de ramnose 3- e 2-ligadas dissulfatadas, o que está de acordo

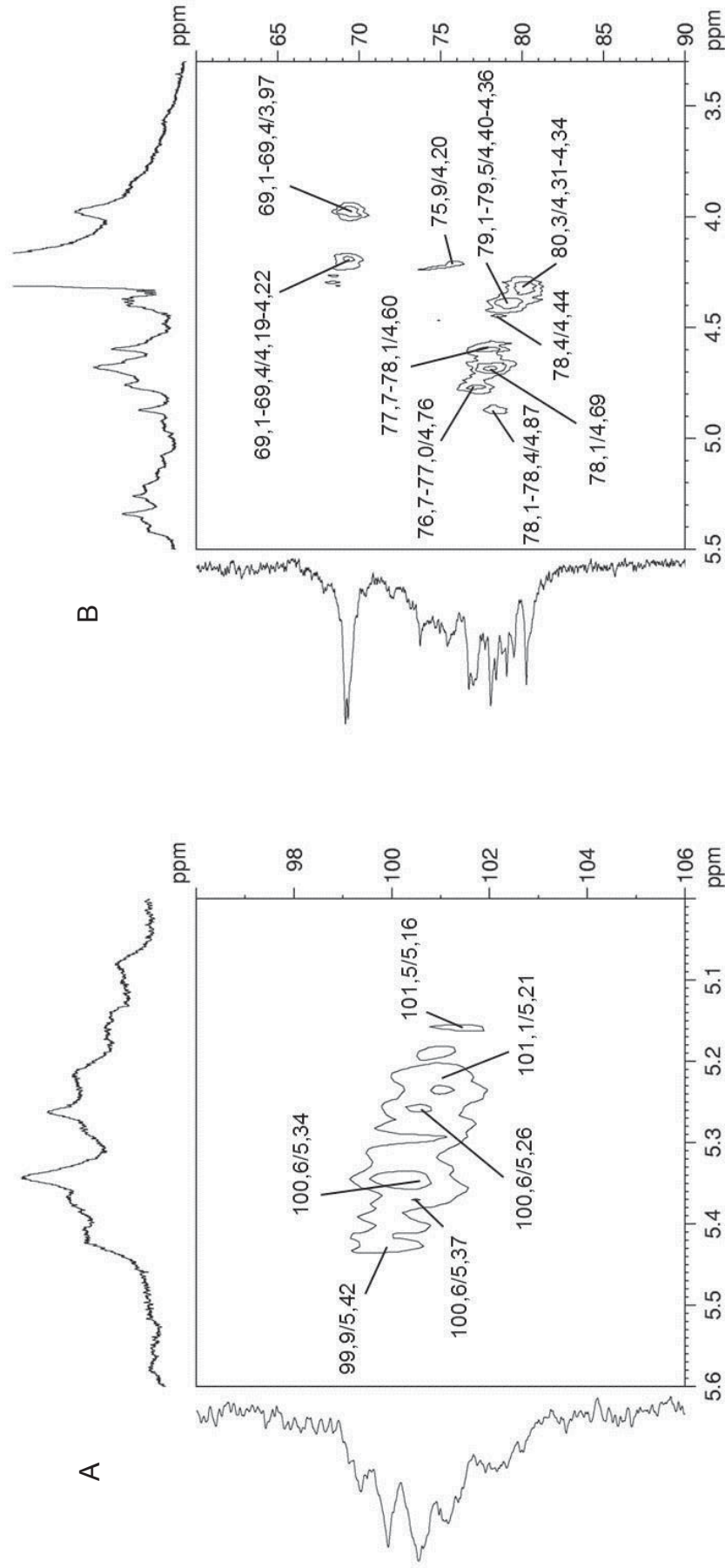
com os resultados de metilação descritos no item 4.5.2, onde 41,7 mol% das unidades de ramnose apresentam-se trissubstituídas.

As heteroramnanas sulfatadas nativas e oversulfatadas foram avaliadas quanto aos efeitos citotóxicos em células tumorais humanas de glioblastoma (linhagem U87MG) e melanoma metastático (linhagem WM9).

FIGURA 37 ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS

Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 2,225 ppm.

FIGURA 38 ESPECTROS DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO Gb1-OS



Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45 e 2,225 ppm.

A: Região anômérica. B: Região dos carbonos do anel

TABELA 20 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS UNI E BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO Gb1-OS

Unidades de ramnose	Deslocamento químico (ppm)						Deslocamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
Gb1-OS												
[→3)-α-L-Rhap-2,4S-(1→]	100,6						5,34					
		78,1	-	80,3	69,4-69,1	18,5-18,2	5,37	4,69	-	4,31-4,34	3,97	1,44-1,39
	99,9						5,42					
[→2)-α-L-Rhap-3,4S-(1→]	101,1	77,7-78,1	78,4	-	69,4-69,1	18,5-18,2	5,21	4,60	4,44	-	3,97	1,44-1,39

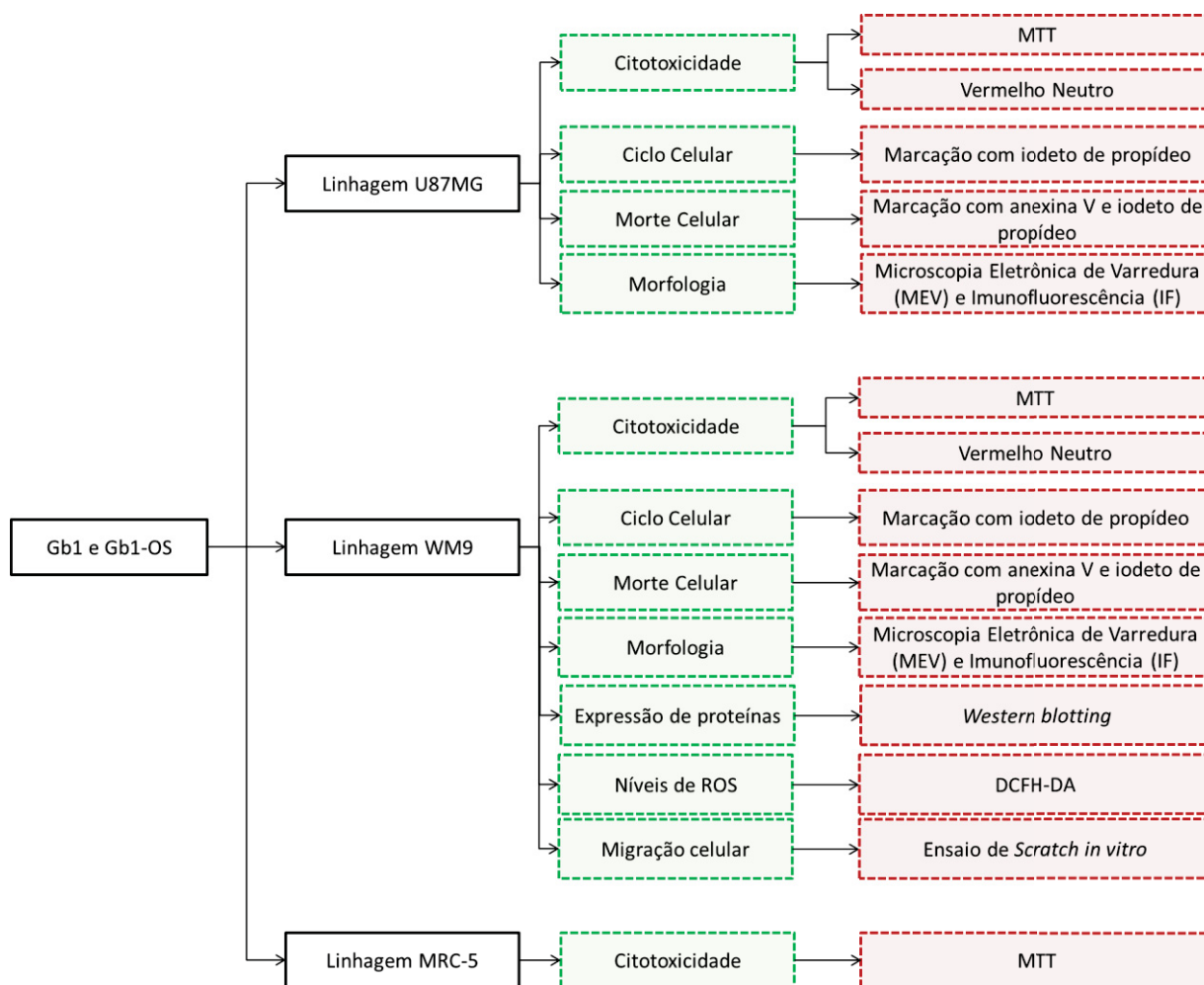
4.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL

Um dos objetivos deste projeto foi avaliar o efeito citotóxico dos polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS em diferentes modelos de células tumorais, a fim de avaliar o efeito da proporção e posicionamento dos grupos sulfato na atividade biológica em estudo, e estabelecer correlações entre estrutura e atividade. Para isto, células tumorais humanas de glioblastoma (linhagem U87MG) e melanoma metastático (linhagem WM9) foram tratadas com os diferentes polissacarídeos e submetidas a análises de viabilidade celular, ciclo celular, morte celular, análise morfológica, ensaios de migração celular, determinação dos níveis de espécies reativas do oxigênio e expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico. A fim de avaliar a citotoxicidade das frações Gb1 e Gb1-OS em células normais, foi realizado um ensaio de MTT com células humanas de fibroblasto (linhagem MRC-5) (FIGURA 39).

Os principais critérios de escolha das linhagens U87MG e WM9 como modelos tumorais deste trabalho foram: alto grau de malignidade, prognóstico ruim, baixa taxa de sobrevida, e principalmente a resistência das células ao tratamento com os quimioterápicos convencionais utilizados na clínica.

Os resultados de atividade antitumoral foram divididos em dois tópicos, referentes primeiramente à linhagem tumoral de glioblastoma humano (U87MG) e na sequência à linhagem tumoral de melanoma humano (WM9).

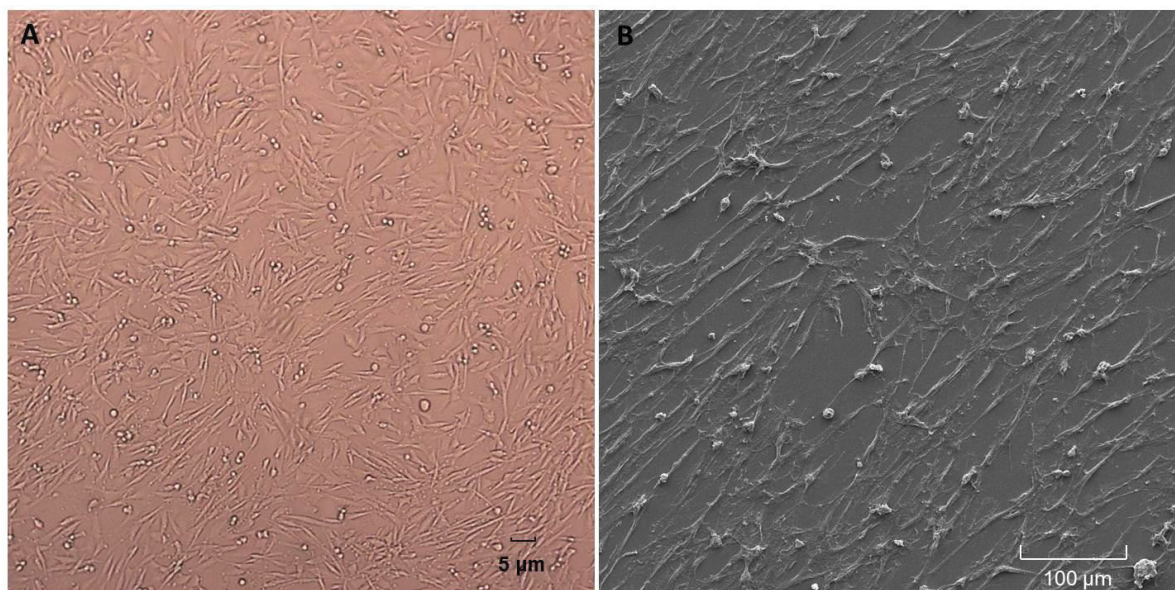
FIGURA 39 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL



4.6.1 Efeito citotóxico dos polissacarídeos em modelo de glioblastoma humano (U87MG)

A linhagem de glioblastoma humano U87MG é classificada como astrocitoma de grau IV, o astrocitoma com maior grau de malignidade. Células U87MG (FIGURA 40) foram utilizadas como modelo celular para avaliar os efeitos que os polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS de *G. brasiliensis* exercem sobre sua viabilidade e possíveis mecanismos citotóxicos pelos quais atuam.

FIGURA 40 CÉLULAS DA LINHAGEM U87MG

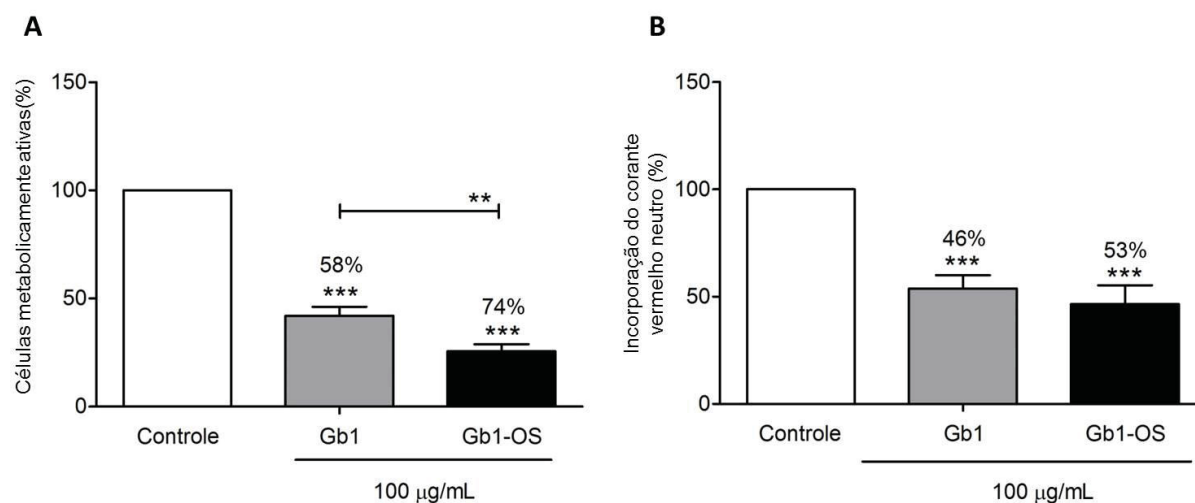


A: aumento de 50x, foto tirada em microscópio de contraste de fase (ZEISS Axiovert 40 CFL); B: aumento de 500x, foto tirada em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN VEGA 3 LMU).

4.6.1.1 Efeito citotóxico dos polissacarídeos em células U87MG

Células U87MG foram tratadas com as frações Gb1 e Gb1-OS, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 72 horas e a atividade metabólica das células foi avaliada por ensaio de MTT. A FIGURA 41A mostra os resultados obtidos. Verificou-se que os polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS promoveram uma diminuição de 58 e 74% de células metabolicamente ativas. A porcentagem de células viáveis foi também avaliada pela capacidade de incorporação do corante vermelho neutro. A FIGURA 41B mostra os resultados obtidos. Observou-se que ambos os polissacarídeos diminuem significativamente a capacidade de incorporação do vermelho neutro, atingindo 46 e 53%, respectivamente. Comparando os efeitos entre a fração sulfatada quimicamente (Gb1-OS) e sua fração de origem (Gb1) no ensaio de MTT, observa-se diferença significativa ($p < 0,01$), indicando que o polissacarídeo oversulfatado tornou-se mais citotóxico. Sugere-se que o aumento do teor de grupos sulfato aliado ao posicionamento destes grupos ao longo da cadeia polissacarídica está influenciando no efeito citotóxico.

FIGURA 41 EFEITO CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS NA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO (U87MG) APÓS TRATAMENTO POR 72 HORAS



Avaliação da citotoxicidade das células U87MG (A: Ensaio de MTT; B: Ensaio de Vermelho Neutro) após o tratamento com 100 µg.mL⁻¹ de polissacarídeo no tempo de 72 horas de exposição. A condição controle foi representada como 100% de células coradas. Os dados mostrados são relativos a 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Thanh *et al.* (2016) mostraram que as ulvanas obtidas de *Ulva lactuca* (18,9% de sulfato e 21,5% de ácidos urônicos) reduzem 100% da viabilidade celular das linhagens tumorais de hepatocarcinoma (HepG2), câncer de mama (MCF-7) e câncer cervical (HeLa) na concentração de 100 µg.mL⁻¹, com valores de IC₅₀ de 29,67; 25,09 e 35,33 µg.mL⁻¹, respectivamente. Além disso, testes *in vitro* com a linhagem de carcinoma de mama humano MCF-7 sugerem que as ulvanas (25 a 200 µg.mL⁻¹) diminuem entre 10 e 40% a viabilidade celular desta linhagem (ELLATEF *et al.*, 2017), assim como das células de adenocarcinoma de mama (EAC, 65% de inibição da viabilidade na concentração de 100 µg.mL⁻¹), carcinoma de cólon (HCT116, aproximadamente 70% na concentração de 100 µg.mL⁻¹) e hepatocarcinoma (HepG2, aproximadamente 65% na concentração de 100 µg.mL⁻¹) (AHMED; AHMED, 2014). Adicionalmente, as ramnanas sulfatadas nativas obtidas de *Monostroma nitidum*, na concentração de 500 µg.mL⁻¹, apresentaram-se citotóxicas (75%) contra células de carcinoma gástrico humano (AGS), enquanto os polímeros purificados apresentaram citotoxicidade variando entre 35 e 55%. Outra linhagem avaliada foi a de carcinoma cervical (HeLa), em que os polissacarídeos

nativos e purificados apresentaram 40% de citotoxicidade, na mesma concentração (KARNJANAPRATUM; YOU, 2011).

Polissacarídeos de algas vermelhas também apresentam atividade antitumoral contra diferentes linhagens. Oligossacarídeos de κ -carragenana obtidos de *Kappaphycus striatum* reduziram a viabilidade de células de carcinoma nasofaríngeo humano (KB), gástrico (BGC) e células HeLa em 22,5%, 50,1% e 54,4%, respectivamente, na maior concentração testada ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (YUAN; SONG, 2005). Células HUVEC tiveram sua viabilidade reduzida após tratamento com κ -carragenana e κ -carragenana oversulfatada, ambas na concentração de 1 mg.mL^{-1} . Entretanto, a inibição da viabilidade após tratamento com o polissacarídeo oversulfatado foi duas vezes maior que o nativo, demonstrando que o aumento do teor de grupos sulfato contribui para um melhor efeito citotóxico (LIANG *et al.*, 2014).

Em nosso grupo de pesquisa (GLICAM-UFPR), o potencial antitumoral de heteroramnanas sulfatadas obtidas de *G. oxysperma* foi investigado contra células U87MG. As frações de menor massa molecular obtidas após degradação controlada de Smith, OXSb ($1,093 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ e 33,5% de grupos sulfato) e OXSc ($2,511 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, 41% de grupos sulfato) reduziram a viabilidade das células U87MG de forma concentração-dependente (10 a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo que a fração OXSb apresentou menor efeito citotóxico. No tempo de 48 horas as frações OXSb e OXSc reduziram 26,6 e 28% da viabilidade celular ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente (ROPELLATO *et al.*, 2015).

A fim de investigar o mecanismo de ação citotóxico das heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas quimicamente de *G. brasiliensis* em células da linhagem U87MG foram realizadas análises de ciclo e morte celular.

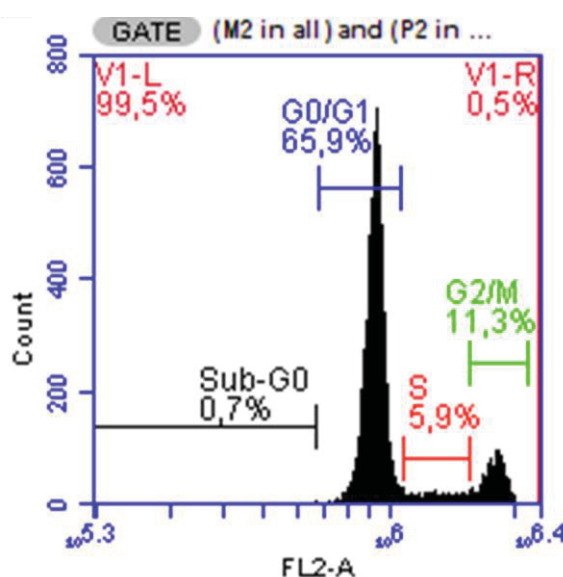
4.6.1.2 Análise do ciclo celular

Estudos realizados anteriormente em nosso grupo de pesquisa por Ropellatto (2011), De Carvalho (2013) e Ropellatto *et al* (2015) mostraram que as células da linhagem U87MG não apresentam indício de morte celular após o tratamento com os polissacarídeos de *G. oxysperma*. Ao contrário, as células apresentaram menor confluência, sugerindo que os polímeros atuam inibindo a proliferação celular. No

presente trabalho, a fim de verificar se as heteroramnanas sulfatadas nativas e sulfatadas quimicamente obtidas de *G. brasiliensis* apresentam o mesmo perfil de modulação do ciclo celular que os polissacarídeos nativos e produtos de baixa massa molar de *G. oxysperma*, células U87MG foram tratadas com as frações Gb1 e Gb1-OS na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 72 h.

A análise do ciclo celular permite quantificar a porcentagem de células em cada fase do ciclo através da marcação com iodeto de propídeo, um composto fluorescente que intercala o DNA. A fluorescência emitida é quantificada através de citometria de fluxo, gerando um histograma a partir do qual é possível identificar e quantificar as células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular (G_1 , S e G_2/M) (FIGURA 42). Adicionalmente, a análise de ciclo celular permite identificar células que apresentam o seu DNA fragmentado, sugerindo indício de morte celular por apoptose.

FIGURA 42 HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS U87MG SEM TRATAMENTO



A FIGURA 43 mostra a distribuição de células U87MG nas fases do ciclo celular. Foi possível observar que a fração Gb1 provoca aumento significativo (13,6%) na proporção de células na fase G_1 . Adicionalmente, a fração Gb1 não causou aumento da proporção de células com DNA fragmentado (FIGURA 44), sugerindo que as heteroramnanas nativas de *G. brasiliensis* apresentam atividade antiproliferativa, e não envolvem indução de morte nas células da linhagem U87MG.

Estes resultados corroboram com o observado por (ROPELLATO *et al.*, 2015), em que as heteroramnanas sulfatadas de *G. oxysperma* e seus produtos de menor massa molar atuam por meio da inibição da proliferação de células U87MG. A fração OXSc promoveu aumento significativo da proporção de células na fase G₁ e diminuiu a proporção de células nas fases S e G₂/M, aumentando os níveis de expressão de p21 e p53, e sem aumento de DNA fragmentado (ROPELLATO *et al.*, 2015).

Em contrapartida, a fração Gb1-OS apresenta diminuição da porcentagem de células em G₁ e aumento da proporção de células distribuídas nas fases S e G₂/M. Adicionalmente, foi observado um aumento estatisticamente significativo (54%) de células com DNA fragmentado em relação ao controle ($p < 0,001$), sugerindo fortemente que a fração Gb1-OS exerce ação antitumoral através da indução de morte celular, provavelmente por apoptose (FIGURAS 43 e 44).

Estes resultados indicam que o maior teor de grupos sulfato presente em Gb1-OS, assim como diferenças estruturais quanto ao posicionamento destes grupos em relação à fração de origem Gb1, influenciam no mecanismo de ação antitumoral destes polímeros.

A fim de confirmar o mecanismo pelo qual Gb1-OS atua, células U87MG tratadas com Gb1 e Gb1-OS foram submetidas à análise de mecanismo de morte celular.

FIGURA 43 PORCENTAGEM DE CÉLULAS U87MG NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS

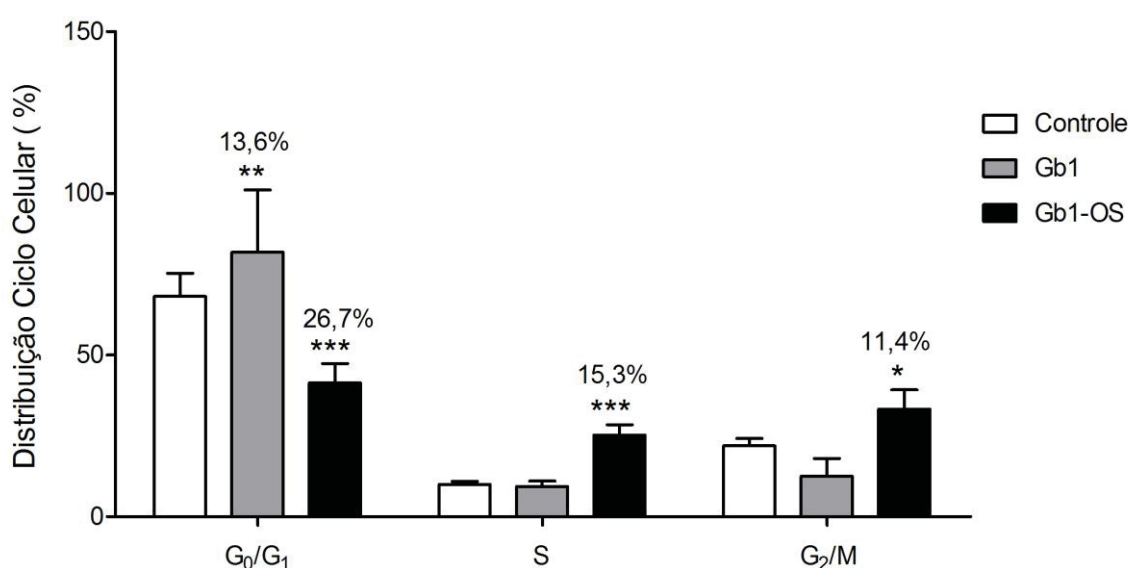


Gráfico representativo de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

FIGURA 44 PORCENTAGEM DE DNA FRAGMENTADO EM CÉLULAS U87MG APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS

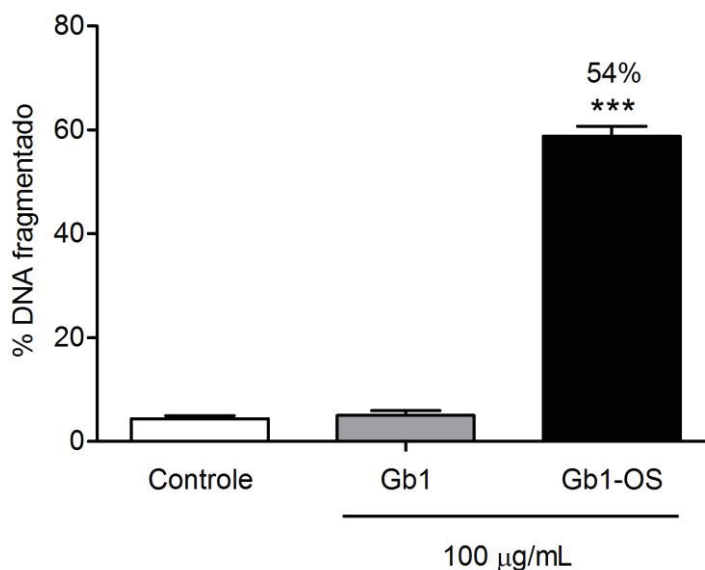


Gráfico representativo de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: ***= $p < 0,001$).

4.6.1.3 Análise do mecanismo de morte celular por anexina e iodeto de propídeo

Quando as células entram em processo de morte celular por apoptose, um dos primeiros eventos que pode ser detectado é a exposição do fosfolípido fosfatidilserina (PS) para fora da membrana plasmática da célula. Isto ocorre desde o início até o final do processo apoptótico, quando a célula gera corpos apoptóticos (GHOSH; ROTH, 2014).

A anexina V é uma proteína com alta afinidade para fosfolípidos, e por isso é largamente utilizada (conjugada a um fluoróforo) como sonda para detectar a exposição prévia da fosfatidilserina na membrana celular. A adição simultânea de um marcador impermeável à membrana plasmática, tal como o iodeto de propídeo (intercalante de DNA), permite diferenciar células com membrana íntegra de células com membrana danificada (GHOSH; ROTH, 2014).

Células que se encontram em apoptose tipicamente serão marcadas com anexina. Se estas células não apresentarem marcação simultânea com iodeto de propídeo, sugere-se que o processo de apoptose é inicial, uma vez que não há perda de integridade da membrana. Por outro lado, quando a membrana perde sua integridade, observa-se dupla marcação (anexina e iodeto de propídeo), indicando

um estágio de apoptose tardia. Células viáveis não apresentam marcação, e células marcadas apenas com iodeto de propídeo sugerem morte celular por necrose. A detecção, discriminação e quantificação de células marcadas frequentemente é realizada por citometria de fluxo (GHOSH; ROTH, 2014).

Células U87MG foram tratadas com os polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por 72 horas, e marcadas com anexina e iodeto de propídeo a fim de avaliar possível mecanismo de ação antitumoral por apoptose. Foi possível observar que ambos os polissacarídeos reduzem a porcentagem de células viáveis em 12,5% para Gb1 e 24,8% para Gb1-OS. Adicionalmente, tanto Gb1 como Gb1-OS aumentam em 13,4% e 12% a porcentagem de células marcadas com anexina. Isto sugere que ambas promovem morte celular por mecanismo de apoptose (FIGURA 45).

FIGURA 45 PORCENTAGEM DE CÉLULAS U87MG MARCADAS OU NÃO COM ANEXINA E/OU IODETO DE PROPÍDEO APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS

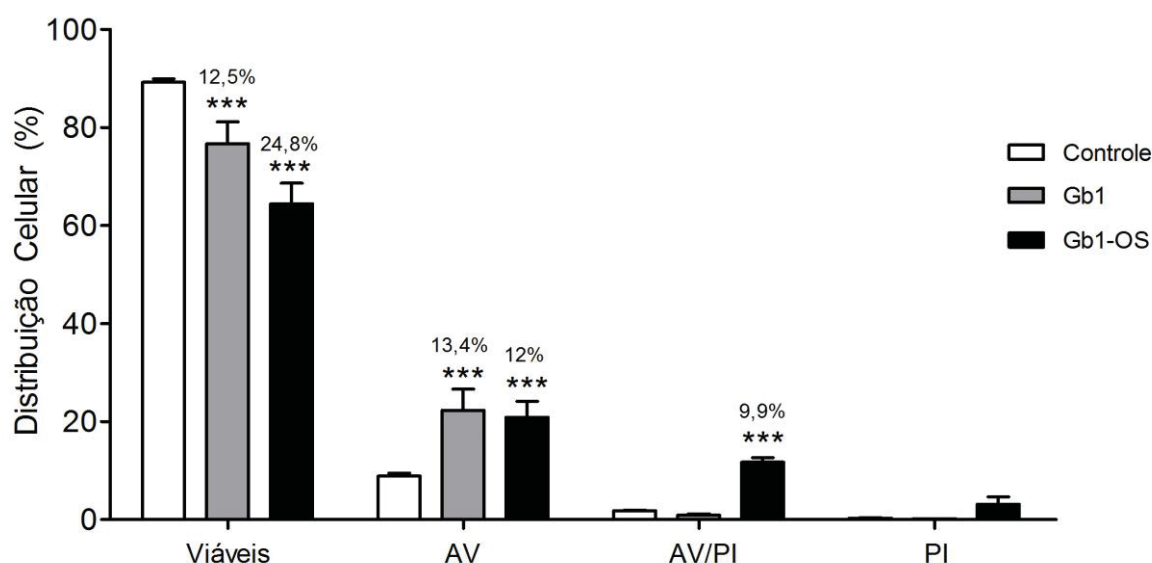


Gráfico representativo de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). AV = células marcadas com anexina V. AV/PI = células duplamente marcadas com anexina V e iodeto de propídeo. PI = células marcadas com iodeto de propídeo.

De forma interessante, apenas a fração quimicamente modificada, Gb1-OS, apresentou aumento significativo das células duplamente marcadas com anexina e iodeto de propídeo (9,9%, FIGURA 45), sugerindo ação citotóxica mais intensa deste polissacarídeo, sendo possível observar exposição da fosfatidilserina com perda da

integridade da membrana plasmática. Estes dados corroboram com a alta porcentagem de DNA fragmentado observada nas análises de ciclo celular (54%, FIGURA 44).

Resumidamente, as heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas de *G. brasiliensis* apresentam efeito citotóxico em células tumorais de glioblastoma (linhagem U87MG), através da indução de mecanismo de morte celular. A fração nativa Gb1 (29,3% de grupos sulfato) promoveu redução da viabilidade celular através do aumento da proporção de células na fase G₁ do ciclo celular (efeito antiproliferativo) e apoptose, ainda sem perda da integridade da membrana plasmática e sem fragmentação do DNA celular. Já a fração Gb1-OS (55% de grupos sulfato) apresentou um efeito citotóxico mais pronunciado, promovendo redução da viabilidade através de mecanismo apoptótico, sendo observada perda da integridade da membrana plasmática e elevada proporção de DNA fragmentado. Sugere-se que as diferenças observadas nos efeitos biológicos são decorrentes das diferenças estruturais entre os dois polissacarídeos: o teor de grupos sulfato, mas principalmente o posicionamento destes grupos na fração Gb1-OS (majoritariamente unidades de ramnose dissulfatadas, ou seja, 3-ligadas sulfatadas em C-2 e C-4, e 2-ligadas sulfatadas em C-3 e C-4).

Adicionalmente, as heteroramnanas de *G. brasiliensis* diferem das heteroramnanas de *G. oxysperma* quanto ao seu mecanismo de ação na linhagem U87MG. As frações Gb1 e Gb1-OS apresentam mecanismo de morte celular, o qual não foi observado para os polissacarídeos nativos nem para os produtos de degradação controlada de Smith obtidos de *G. oxysperma*. Estes resultados sugerem que diferenças estruturais tais como o teor e o posicionamento dos grupos sulfato interferem no mecanismo de ação dos polissacarídeos.

Fucoidanas sulfatadas (13,5% de grupos sulfato) obtidas de *Cladosiphon okamuranus* e seu produto quimicamente sulfatado (32,8% de grupos sulfato) reduziram a viabilidade de células de leucemia U937 em ~ 20% e mais que 90%, respectivamente, tratadas durante 72 horas com uma concentração de 100 µg.mL⁻¹. Apenas o polissacarídeo oversulfatado causou apoptose e ativou as caspases 3 e 7. Os autores discutem que o aumento da porcentagem de grupos sulfato e o posicionamento específico em C-2 e/ou C-4 da fucoidana oversulfatada são fatores importantes para a atividade desempenhada (TERUYA *et al.*, 2007).

As heteroramnanas sulfatadas de *G. brasiliensis* oversulfatadas (Gb1-OS) foram mais citotóxicas em comparação com o polímero de origem (Gb1), sugerindo que a inserção de grupos sulfato nos carbonos C-3 e C-4 de unidades de ramnose 2-ligadas, assim como nos carbonos C-2 e C-4 de unidades de unidades de ramnose 3-ligadas, e que a sulfatação dos terminais não redutores de ramnose, assim como de outras unidades tais como xilose e glucose, tem papel essencial para o efeito biológico mais pronunciado.

É de grande relevância a escolha de mais de um método para avaliação da morte celular (GHOSH; ROTH, 2014). Neste trabalho, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.) para avaliar possíveis alterações na ultra-estrutura das células U87MG tratadas com os polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS. Esta análise foi realizada em colaboração com a professora Dr^a Célia Regina Cavicchiolo Franco, do Departamento de Biologia Celular da UFPR.

4.6.1.4 Análise morfológica e ultraestrutural de células U87MG por microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.)

A análise ultra-estrutural tem sido tradicionalmente considerada um dos métodos mais confiáveis para identificação de células apoptóticas, uma vez que células em processo de morte apresentam mudanças súbitas na estrutura das organelas, o que ocorre previamente à cascata de eventos que leva à morte celular. As mudanças ultraestruturais são marcadas pela condensação do núcleo e do citoplasma, fragmentação do núcleo e formação de protuberâncias que se formam sobre a superfície celular produzindo os corpos apoptóticos, os quais são ingeridos por diferentes células fagocíticas *in vivo* e rapidamente removidos do meio sem iniciação de resposta inflamatória (GHOSH; ROTH, 2014).

Empregou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais nas células de glioblastoma humano, frente aos tratamentos com os polissacarídeos nativos e modificados de *G. brasiliensis*.

Os resultados observados na FIGURA 46 (imagens 1, 2, 3, 4, 5 e 6) representam células controle, somente mantidas na presença de meio, por um

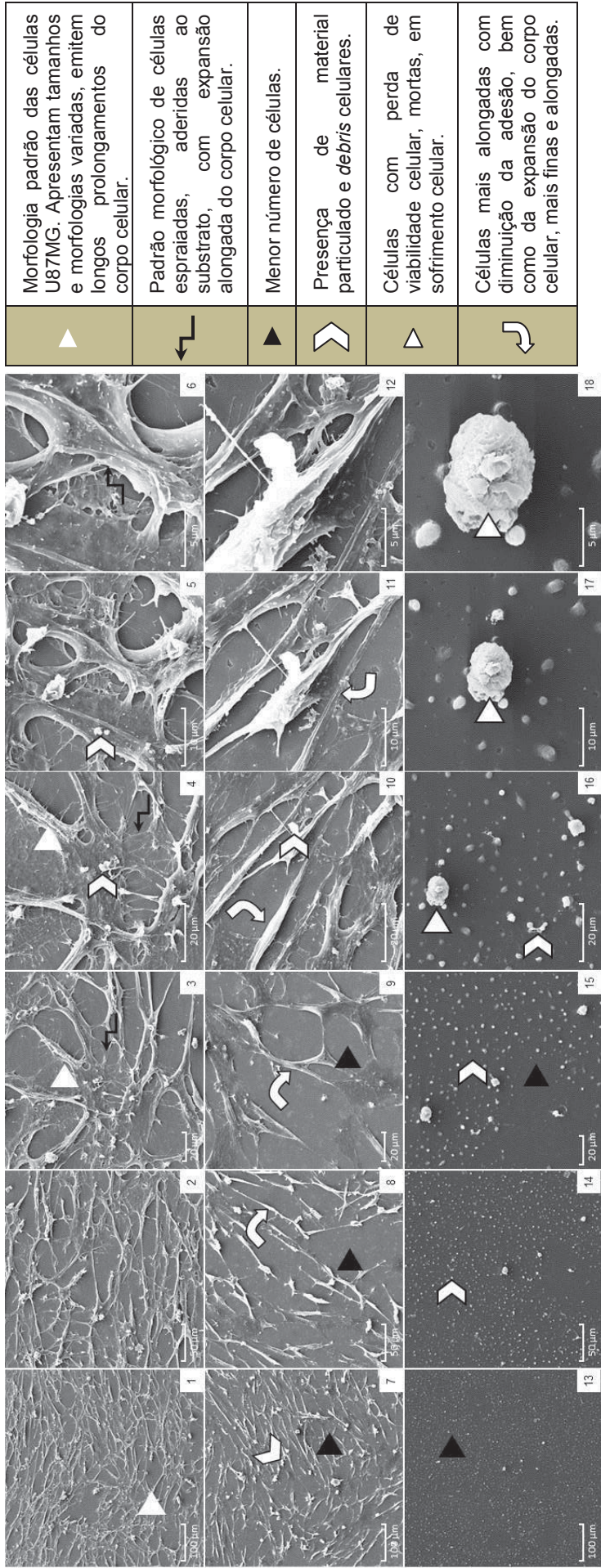
período de 72 horas. Pode-se observar nas imagens de menor magnitude (imagens 1 e 2) que estas células não apresentam morfologia definida. Apresentam longas projeções do corpo celular, formando longos prolongamentos. Em maior magnitude (imagens 3, 4, 5 e 6) pode-se observar que estas células estão em íntimo contato com o substrato, portanto, são células aderidas e espreiadas. Estas células empilham-se umas sobre as outras, não mantendo a inibição por contato, características de células tumorais. Há presença de material particulado por sobre o corpo celular. Algumas células no cultivo celular apresentam-se com maior expansão, mais aderidas e mais espreiadas.

Nas imagens 7, 8, 9, 10, 11 e 12 são observadas as células após o tratamento com o polissacarídeo nativo Gb1 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Houve diminuição do número de células quando comparado com as células controle, podendo-se observar maior espaçamento entre as mesmas. Pode-se observar na imagem de menor magnitude (7) células arredondadas, bem como *debris* celulares, características de células em sofrimento ou perdendo a adesão ao substrato. As células perderam seu padrão morfológico, e apresentam-se alongadas, com morfologia afilada, e poucas são as células que mantiveram espreiadas por sobre o substrato, emitindo expansões membranares. Por haver menor número de células no cultivo celular, estas estão mais dispostas lado a lado, não havendo mais tanta sobreposição entre as mesmas (imagens 9, 10, 11 e 12).

De forma muito interessante, pode-se observar nas imagens 13, 14, 15, 16, 17 e 18 que a fração oversulfatada Gb1-OS ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), no mesmo tempo de exposição, induziu total alteração da morfologia celular, bem como no número de células presentes no cultivo, resultado este característico de mecanismo de morte celular. Observa-se ausência de células aderidas ou espreiadas ao substrato. Estas, quando presentes, apresentam-se com morfologia arredondada, características de células mortas. Há um predomínio de *debris* celulares.

Deste modo, pode-se concluir através da análise de microscopia eletrônica de varredura, que ambas frações Gb1 e Gb1-OS alteram a morfologia das células U87MG de formas diferentes, corroborando com os resultados apresentados anteriormente no item 4.6.1.

FIGURA 46 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO (U87MG) EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS



As imagens 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representam células mantidas somente no meio de cultivo. As imagens 7, 8, 9, 10, 11 e 12 referem-se às células após tratamento com a fração Gb1 (100 µg.mL⁻¹). As imagens 13, 14, 15, 16, 17 e 18 referem-se às células após tratamento com a fração Gb1-OS (100 µg.mL⁻¹). Aumentos: 1, 7 e 13 = 500 x. 2, 8 e 14 = 1000x. 3, 9 e 15 = 2000 x. 4, 10 e 16 = 4000x. 5, 11 e 17 = 8000x. 6, 12 e 18 = 16000x. Esses resultados representam triplicatas biológicas.

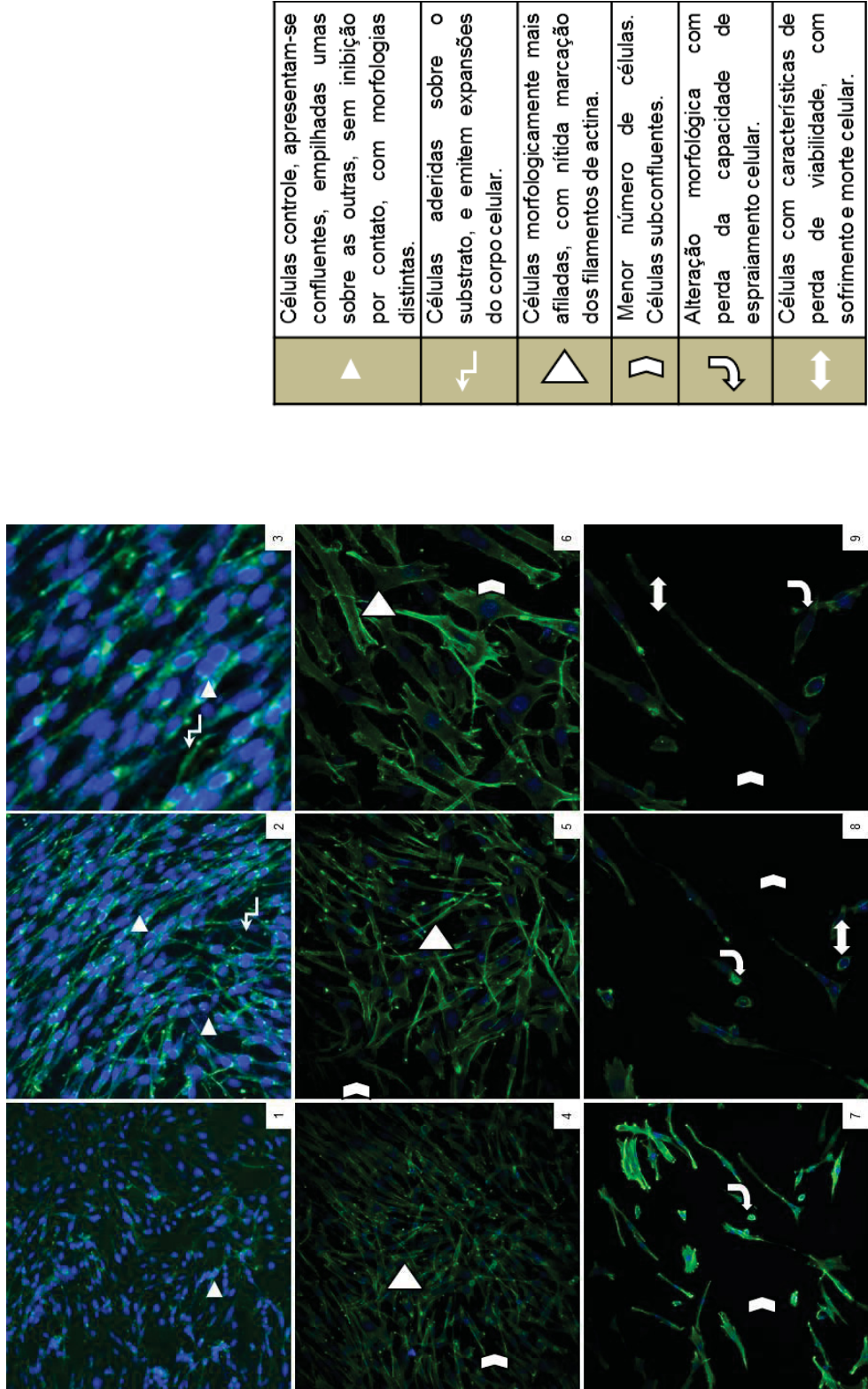
4.6.1.5 Análise morfológica de células de glioblastoma humano (U87MG) por microscopia confocal de imunofluorescência

As imagens 1, 2 e 3 (FIGURA 47) representam células controle, as quais foram mantidas apenas na presença de meio de cultivo por um período de 72 horas. Os microfilamentos de actina foram detectados empregando marcação com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488, e os núcleos das células foram detectados através da marcação com DAPI. As imagens evidenciam que as células estão confluentes, apresentam-se empilhadas umas sobre as outras de forma a não respeitar a inibição por contato, e apresentam morfologia muito distinta. São células que estão aderidas sobre o substrato e que emitem expansões do corpo celular.

As imagens 4, 5 e 6 (FIGURA 47) evidenciam células expostas à fração Gb1 na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Estas células são morfolologicamente mais afiladas, com nítida marcação dos filamentos de actina. Há uma população de células com maior expansão do corpo celular e prolongamentos membranares, as quais estão mais aderidas e espraídas sobre o substrato. Com este tratamento, pode-se observar menor número de células, que se apresentam mais espaçadas entre si, características de células subconfluentes.

As imagens 7, 8 e 9 (FIGURA 47) evidenciam células expostas ao tratamento com a fração Gb1-OS ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). De forma evidente foi possível observar poucas células sobre o substrato. As células que permanecem aderidas apresentam nítida alteração da morfologia celular quando comparadas com as células controles, com perda da capacidade de espraçamento sobre o substrato, mas mantendo a morfologia de células alongadas e afiladas. Vê-se também uma população de células que perderam capacidade de adesão, e morfolologicamente são células arredondadas. Este tratamento, de forma nítida, induziu diminuição do número de células, perda da capacidade de adesão, bem como do grau de espraçamento, característico de células com perda de viabilidade, em sofrimento e morte celular.

FIGURA 47 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO (U87MG) EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS

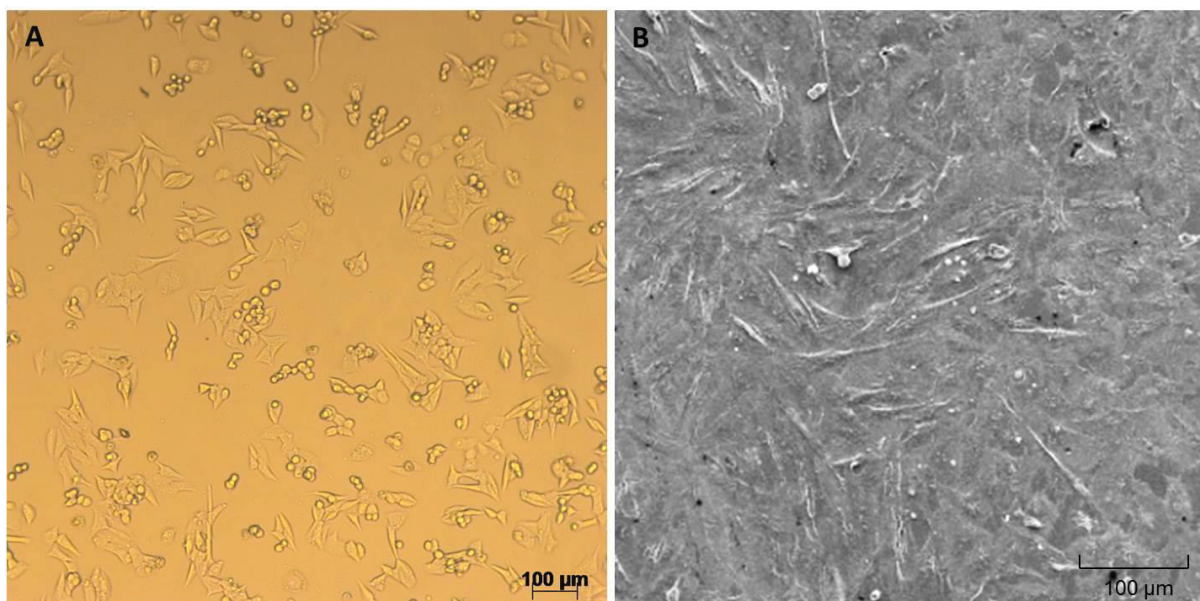


As imagens 1, 2 e 3 representam células mantidas somente no meio de cultivo. As imagens 4, 5 e 6 referem-se às células após tratamento com a fração Gb1 (100 µg.mL⁻¹). As imagens 7, 8 e 9 referem-se às células após tratamento com a fração Gb1-OS (100 µg.mL⁻¹). Aumentos: 1, 4 e 7 = 200x. 2, 5 e 8 = 400x. 3, 6 e 9 = 600x. Esses resultados representam triplicatas biológicas.

4.6.2 Efeito citotóxico dos polissacarídeos em modelo de melanoma humano (WM9)

Uma vez avaliados os efeitos citotóxicos das frações Gb1 e Gb1-OS em células de glioblastoma humano, uma segunda linhagem celular foi escolhida para comparação dos mecanismos exercidos por estes polissacarídeos. Para isso, células de melanoma humano (linhagem WM9, FIGURA 48) foram submetidas a análises de viabilidade, ciclo e morte celular, morfologia, além de ensaios para determinar os níveis de espécies reativas do oxigênio, os efeitos sobre a migração celular e sobre a expressão de proteínas.

FIGURA 48 CÉLULAS DA LINHAGEM WM9



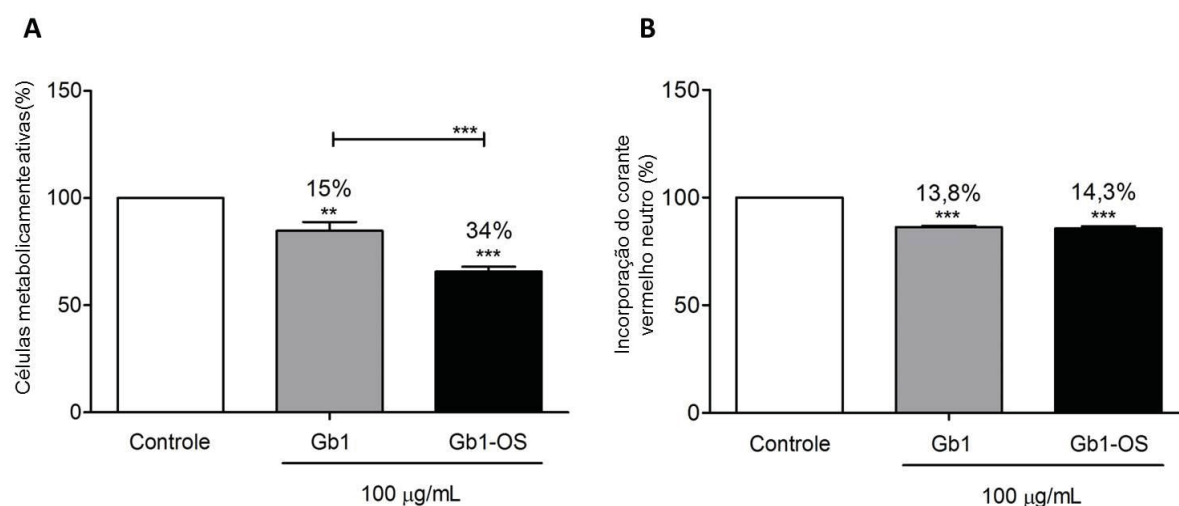
A: aumento de 200x, em microscópio de contraste de fase (ZEISS Axiovert 40 CFL); B: aumento de 500x, em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN VEGA 3 LMU).

4.6.2.1 Efeito citotóxico dos polissacarídeos em células WM9

Células WM9 foram tratadas com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações Gb1 e Gb1-OS e os efeitos citotóxicos foram avaliados a partir de dois métodos distintos: MTT e vermelho neutro (FIGURA 49). Após 72 horas de tratamento, verificou-se que ambos

os polissacarídeos levaram a uma diminuição estatisticamente significativa da porcentagem de células metabolicamente ativas, de 15 e 34% quando avaliados pelo método do MTT (FIGURA 49A). A capacidade celular de incorporação do vermelho neutro também foi avaliada, e observou-se que Gb1 e Gb1-OS reduzem significativamente a capacidade de incorporação do vermelho neutro em 13,8 e 14,3% (FIGURA 49B). Comparando os efeitos entre a fração sulfatada quimicamente (Gb1-OS) e sua fração de origem (Gb1), observa-se diferença significativa ($p < 0,01$) somente pelo método do MTT, indicando que o polissacarídeo oversulfatado é mais eficaz em reduzir a porcentagem de células metabolicamente ativas, assim como observado para a linhagem U87MG.

FIGURA 49 EFEITO CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS NA LINHAGEM DE MELANOMA HUMANO (WM9) APÓS TRATAMENTO POR 72 HORAS



Avaliação de citotoxicidade das células WM9 (A: Ensaio de MTT; B: Ensaio de Vermelho Neutro) após o tratamento com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo no tempo de 72 horas de exposição. A condição controle foi representada como 100% de células coradas. Os dados mostrados são relativos a 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Ale *et al* (2011b) avaliaram o efeito citotóxico de galactofucanas sulfatadas e fucanas sulfatadas de *Sargassum henslowianum* e *Fucus vesiculosus*, respectivamente, em células de melanoma B16, e observaram que após 24 horas de tratamento, os polissacarídeos diminuíram a porcentagem de células metabolicamente ativas de forma concentração-dependente. Os efeitos citotóxicos foram observados com concentrações de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ até $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, variando entre 20% e 90% em relação ao controle.

Adicionalmente, células de melanoma B16 foram expostas a fucoïdanas nativas extraídas de *Sargassum* sp., ou comercial (Sigma-Aldrich), e após 24 horas foi observado que as fucoïdanas de *Sargassum* sp. reduziram a porcentagem de células viáveis em 44% e 50%, com concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Já as fucoïdanas de *F. vesiculosus*, em concentrações variando de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reduziram a porcentagem de células viáveis em 45% a 90%, de forma concentração dependente (ALE *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por (PENG *et al.*, 2012) mostrou que três polissacarídeos obtidos da alga parda *Laminaria japonica*, compostos por diferentes tipos de monossacarídeos, inibiram o crescimento de células de melanoma humano (linhagem A375), após 24 horas de tratamento. O polissacarídeo bruto, WPS, com 12,5% de grupos sulfato e composto majoritariamente por galactose (56%) e fucose (26%), inibiu a viabilidade celular em cerca de 35% (concentração de 2 mg.mL^{-1}). Já a fração WPS-2 (12,7% de grupos sulfato) foi obtida após cromatografia de troca iônica, apresentou majoritariamente fucose (45,1%), galactose (20,9%) e ramnose (20%), e inibiu cerca de 45% a viabilidade celular (concentração de 2 mg.mL^{-1}). Esta fração foi purificada por cromatografia de troca iônica gerando a fração WPS-2-1 (13,9% de grupos sulfato), cuja composição monossacarídica mostrou majoritariamente ramnose (36,4%) seguida de fucose (18,4%). A fração WPS-2-1 (2 mg.mL^{-1}) inibiu em 65% a viabilidade das células de melanoma. Os autores sugerem que a diferença entre os efeitos de cada polissacarídeo é devida às diferentes composições monossacarídicas, já que a fração WPS-2-1 apresentava mais ramnose e manose do que as demais. Ainda sugerem que possivelmente a presença de sulfato nos terminais não redutores induz a interação do polissacarídeo com as células.

Dando continuidade aos estudos com os polissacarídeos de *L. japonica*, Peng *et al* (2013) observaram que após exposição das células A375 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do polissacarídeo WPS-2-1 por 48 horas, a redução da viabilidade foi mais pronunciada (72%) em relação ao tempo de 24 horas (35%), mas semelhante ao tempo de 72 horas (69,5%) (PENG *et al.*, 2013).

As galactofucanas sulfatadas e parcialmente acetiladas obtidas das algas pardas *Saccharina japonica* e *Undaria pinnatifida* demonstraram potente atividade citotóxica em células de melanoma SK-MEL-28, após tratamento por 48 horas. As porcentagens de inibição variaram entre 46% e 21%, na concentração de 200

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (VISHCHUK *et al.*, 2011). Por outro lado, as fucoidanas obtidas de *Fucus evanescens* inibiram entre 46% e 51% a proliferação de células de melanoma RPMR-7951, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (VISHCHUK *et al.*, 2013).

Dados publicados na literatura frequentemente utilizam o modelo de células de melanoma para avaliar os efeitos de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas pardas. Vale ressaltar que, até o presente momento, esta é a primeira vez que é descrito o efeito citotóxico de polissacarídeos sulfatados de algas verdes em modelo de células de melanoma humano (linhagem WM9).

A fim de verificar como as heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas de *G. brasiliensis* atuam inibindo a viabilidade das células WM9 foi realizado o ensaio de ciclo celular.

4.6.2.2 Análise do ciclo celular

As células de melanoma foram tratadas com as frações Gb1 e Gb1-OS por 72 horas, e a FIGURA 50 mostra a distribuição de células WM9 nas fases do ciclo celular. Nenhuma fração foi capaz de alterar significativamente a proporção de células em cada fase do ciclo celular, quando comparadas com o controle.

FIGURA 50 PORCENTAGEM DE CÉLULAS WM9 NA DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS

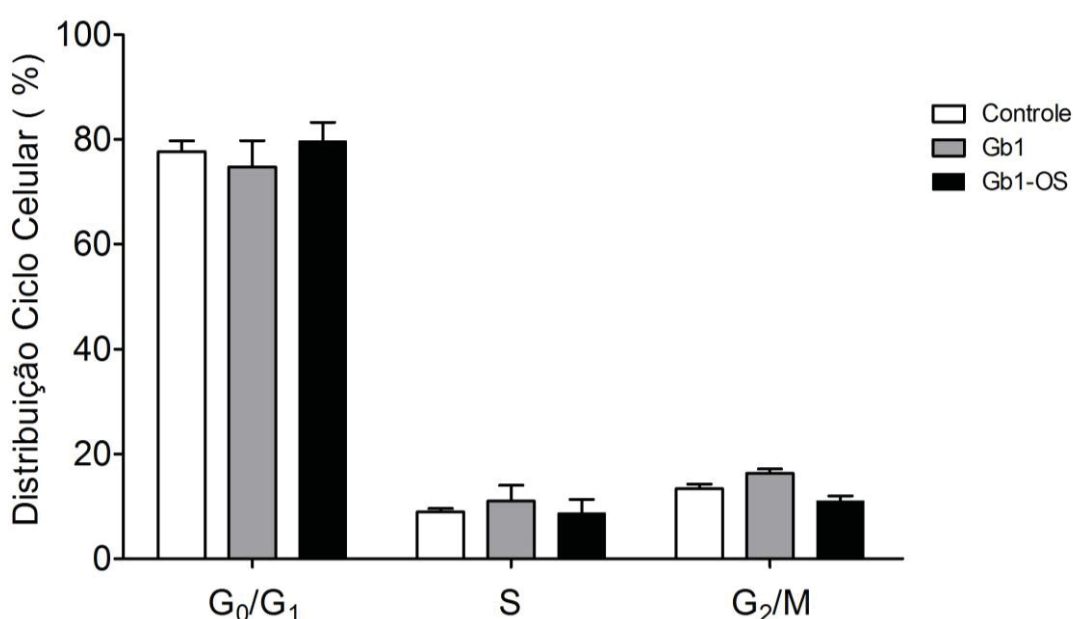


Gráfico representativo de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Entretanto, ambas as frações foram capazes de aumentar a proporção de células com DNA fragmentado, de forma estatisticamente significativa (FIGURA 51). Adicionalmente, a proporção de DNA fragmentado nas células tratadas com o polissacarídeo oversulfatado (Gb1-OS) foi significativamente maior ($p < 0,001$) quando comparada com Gb1. Estes resultados sugerem que as heterorramnanas nativas e modificadas de *G. brasiliensis* não tem efeito sobre o ciclo celular, e possivelmente atuam na linhagem WM9 por mecanismo de morte celular.

A fim de confirmar esta hipótese, as células WM9 foram submetidas ao ensaio de morte celular com marcação de anexina/iodeto de propídeo.

FIGURA 51 PORCENTAGEM DE DNA FRAGMENTADO EM CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS

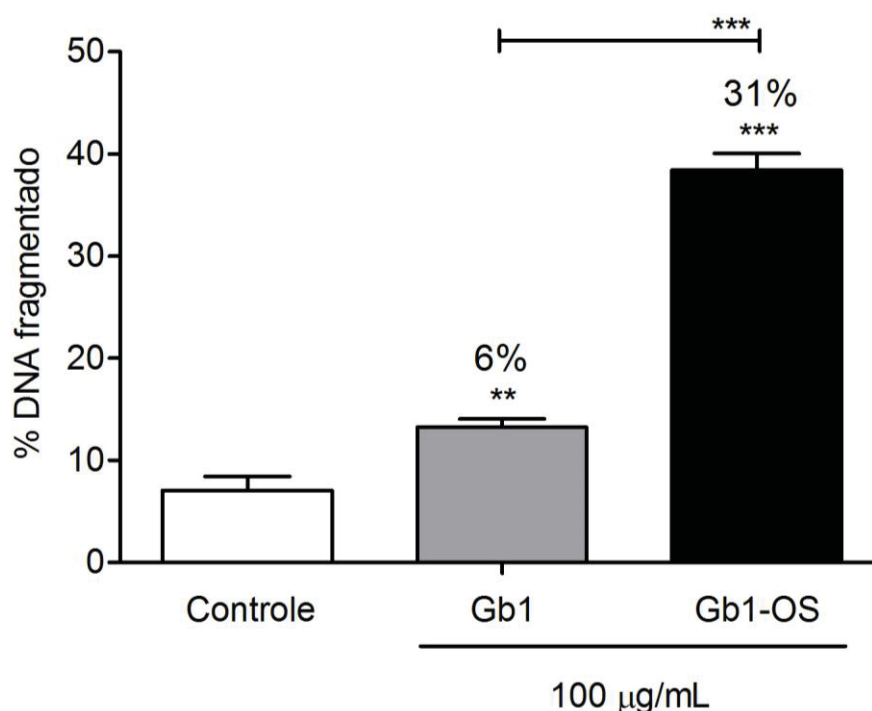


Gráfico representativo de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: ***= $p < 0,001$).

4.6.2.3 Análise da morte celular por anexina e iodeto de propídeo

Após o tratamento com os polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por 72 horas, as células WM9 foram marcadas com anexina e iodeto de propídeo a fim de avaliar a hipótese de morte celular por apoptose

sugerida no tópico anterior. Foi possível observar na FIGURA 52 que ambos os polissacarídeos reduzem a porcentagem de células viáveis em 15% para Gb1 e 17% para Gb1-OS. Adicionalmente, tanto Gb1 como Gb1-OS aumentam em 10% e 6% a porcentagem de células marcadas somente com anexina, e em 3,4 e 7,1% a porcentagem de células duplamente marcadas, respectivamente.

Vale ressaltar que houve diferença estatística significativa entre as frações na marcação com anexina e com anexina/iodeto de propídeo. A fração Gb1 apresentou maior porcentagem de células marcadas com anexina do que com dupla marcação, e o oposto foi observado para a fração Gb1-OS. Estes resultados sugerem que ambos os polissacarídeos tem ação citotóxica, promovendo possivelmente morte por mecanismo de apoptose. Estes dados corroboram com os observados anteriormente, em que Gb1 provoca menor redução da viabilidade celular (15%) e apresenta menor porcentagem de células com DNA fragmentado (8%) quando comparada com Gb1-OS (34% de redução da viabilidade e 32% de DNA fragmentado).

As galactofucanas sulfatadas e fucanas sulfatadas de *Sargassum henslowianum* e *Fucus vesiculosus* apresentam citotoxicidade em células de melanoma B16. Na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ambos os polissacarídeos apresentaram de 41% e 30% de células marcadas com anexina V/7-AAD, respectivamente, sugerindo apoptose. Além disso, a atividade da caspase-3 foi significativamente aumentada em resposta ao tratamento com estes polissacarídeos. Os autores sugerem que o efeito destes polissacarídeos sobre as células tumorais é devido ao grau de sulfatação e distribuição destes grupos. Os grupos sulfato das fucanas substituem principalmente C-2 e C-4. Por outro lado, as galactofucanas apresentam substituição por sulfato em C-2 e/ou C-3 da fucose e da galactose (ALE *et al.*, 2011).

Adicionalmente, a fração WPS-2-1 obtida de *Laminaria japonica* e discutida no item 4.6.2.1, induziu apoptose nas células de melanoma humano A375, detectada através da indução da expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. O aumento da razão Bax/Bcl-2 (duas vezes mais em relação ao controle) foi correlacionada com o aumento da concentração de WPS-2-1 (1 mg.mL^{-1}). Ainda, foi observado a diminuição do potencial de membrana mitocondrial com o aumento da concentração

de polissacarídeo, e o aumento das atividades da caspase 3 e da caspase 9 (PENG *et al.*, 2013).

FIGURA 52 PORCENTAGEM DE CÉLULAS WM9 MARCADAS OU NÃO COM ANEXINA E/OU IODETO DE PROPÍDEO APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS

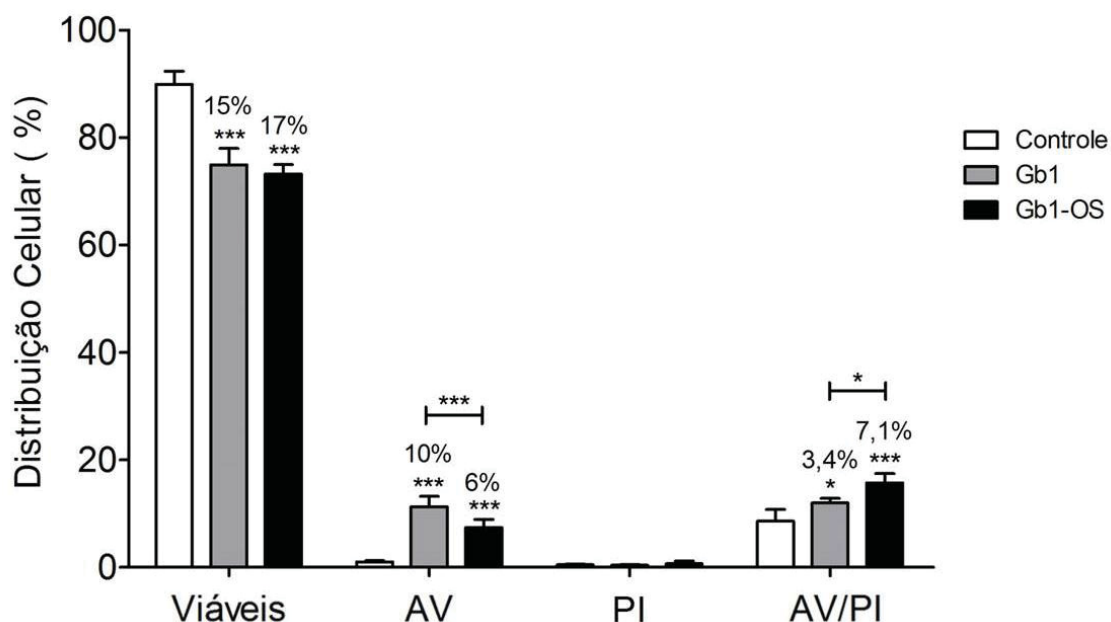


Gráfico representativo de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). AV = células marcadas com anexina V. AV/PI = células duplamente marcadas com anexina V e iodeto de propídeo. PI = células marcadas com iodeto de propídeo.

As heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas de *G. brasiliensis* apresentam efeito citotóxico em células humanas de melanoma metastático (linhagem WM9), provavelmente através de mecanismo de morte celular por apoptose. As células tratadas com Gb1 ou Gb1-OS apresentaram marcação com anexina, sugerindo que o processo apoptótico foi desencadeado. Da mesma forma, foi observada dupla marcação das células com anexina e iodeto de propídeo, indicando que nesta etapa já houve a permeabilização da membrana plasmática e sugerindo que o processo de morte está em fase final. Vale destacar que a fração Gb1-OS foi capaz de induzir o processo de morte celular de forma mais intensa quando comparada com Gb1, o que foi observado pela maior porcentagem de células duplamente marcadas.

Sugere-se que a ação potencializada de Gb1-OS ocorre devido às diferenças estruturais que apresenta em relação a Gb1: teor e posicionamento dos grupos sulfato. A fração nativa Gb1 (29,3% de grupos sulfato) apresenta menor quantidade

de unidades de ramnose dissubstituídas quando comparada com Gb1-OS (55% de grupos sulfato), e possivelmente esta é a causa da maior eficiência apresentada por Gb1-OS.

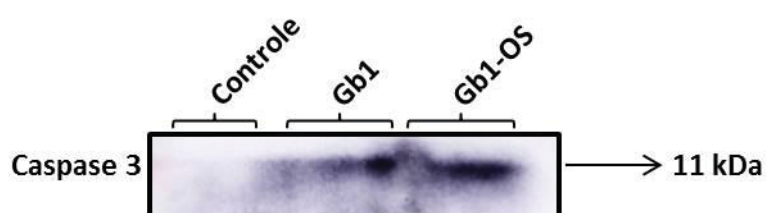
A fim de confirmar que os polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS são capazes de induzir o processo de apoptose, foram avaliados os níveis de expressão da proteína caspase 3 fosforilada, por ensaios de *Western blotting*.

4.6.2.4 Expressão de caspase 3 envolvida no processo apoptótico

A expressão da proteína caspase 3 na sua forma fosforilada foi avaliada por western blotting a partir de extratos protéicos obtidos de células de melanoma (WM9) após os tratamentos com Gb1 e Gb1-OS ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi possível observar (FIGURA 53) que as células WM9 mantidas na condição controle (sem tratamento) não apresentam níveis detectáveis de caspase-3 fosforilada. É possível verificar que a intensidade da banda correspondente à caspase 3 fosforilada aumentou em resposta aos tratamentos com Gb1 e Gb1-OS. Este resultado confirma as análises anteriores, mostrando que ambas as frações induzem morte celular por apoptose nas células de melanoma (WM9).

Vale destacar que o tratamento das células WM9 com a fração Gb1-OS promoveu um efeito potencializado na expressão de caspase 3 fosforilada, quando comparada com a fração Gb1, corroborando as análises anteriores em que foi observado maior porcentagem de células duplamente marcadas (anexina e iodeto de propídeo) e maior proporção de DNA fragmentado (FIGURAs 52 e 51).

FIGURA 53 *WESTERN BLOT* PARA DETECÇÃO DE CASPASE 3 FOSFORILADA NA LINHAGEM WM9 APÓS TRATAMENTO COM Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS



Possíveis alterações ultraestruturais das células WM9 tratadas com Gb1 e Gb1-OS foram avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Esta análise foi realizada em colaboração com a professora Dr^a Célia Regina Cavicchiolo Franco, do Departamento de Biologia Celular da UFPR.

4.6.2.5 Análise morfológica e ultraestrutural de células de melanoma humano por microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.)

As células de melanoma foram analisadas quanto ao seu padrão morfológico e ultraestrutural, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), frente aos tratamentos com os polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS.

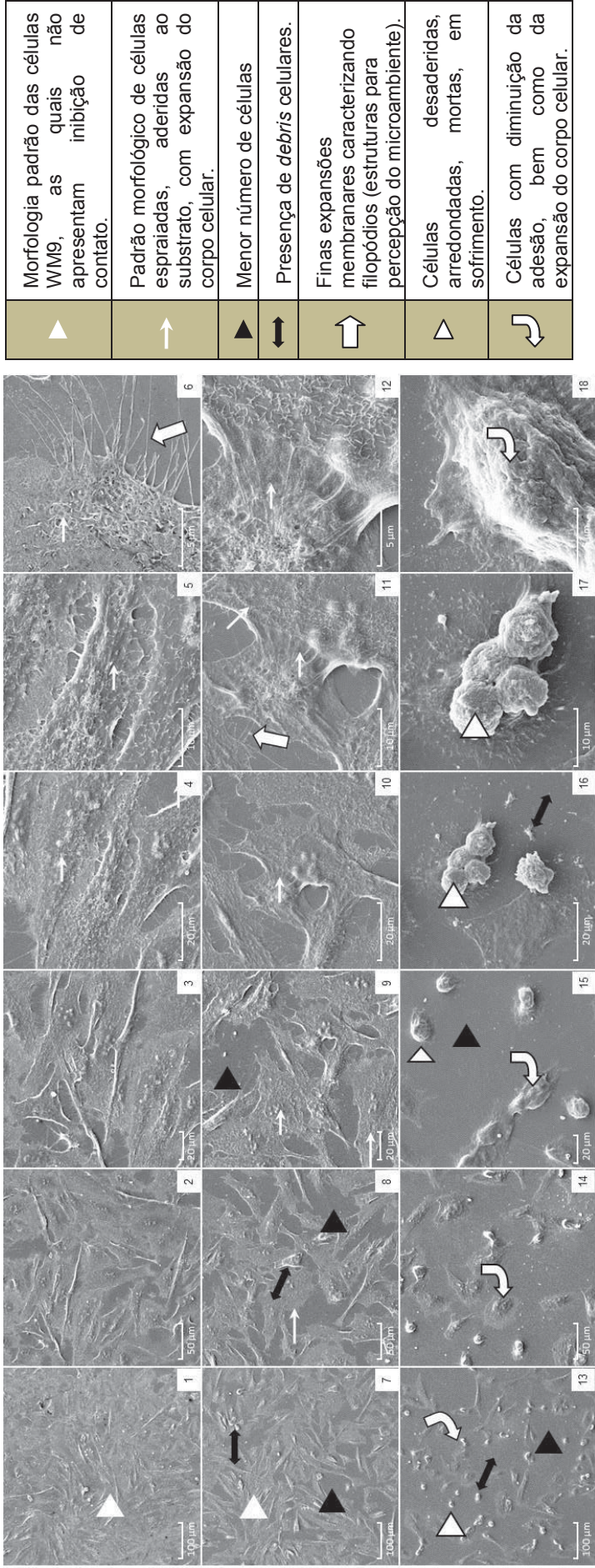
As imagens 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (FIGURA 54) evidenciam o padrão morfológico e ultraestrutural da linhagem de melanoma humano WM9 (células controle) mantidas em cultivo celular por 72 horas. Pode-se observar na imagem 1 que essas células estão confluentes, não respeitam a inibição por contato, apresentando empilhamento celular. Em maior magnitude (imagens 2, 3, 4 e 5, FIGURA 54) pode-se observar que estas estão aderidas e espalhadas por sobre o substrato. A análise ultraestrutural em maior magnitude (imagens 5 e 6, FIGURA 54) estas apresentam finas expansões membranares característicos filopódios, estruturas para percepção do microambiente.

As imagens 7, 8, 9, 10, 11 e 12 (FIGURA 54) evidenciam células expostas ao polissacarídeo Gb1 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) mantidas em cultura pelo mesmo período de tempo. Observa-se nas imagens 7 e 8 um menor número de células quando comparadas com as células controle (imagem 1), havendo maior espaçamento celular entre as mesmas. Em maior magnitude (imagens 8, 9, 10, 11 e 12, FIGURA 54) pode-se observar alguns *debris* celulares. Estas células mantém contato íntimo umas com as outras, apresentando-se aderidas e espalhadas por sobre o substrato, características estas também observadas para as células tratadas somente com meio de cultivo (controle).

De forma evidente, o tratamento com o polissacarídeo Gb1-OS ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) induziu nítida alteração morfológica e ultraestrutural desta linhagem quando exposta a esse polissacarídeo (imagens 13 a 18, FIGURA 54). Há um número muito reduzido

de células, estas perdem a capacidade de adesão e espraio ao substrato. Poucas células se mantêm aderidas e há nítida diminuição da capacidade de espraio do corpo celular. Observa-se um predomínio das células desaderidas com morfologia arredondada, características de células em sofrimento ou morte celular. Em maior magnitude (imagens 14, 15, 16, 17 e 18, FIGURA 54) estas células com perda de viabilidade apresentam-se isoladas ou formando agregados entre si.

FIGURA 54 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO (WM9) EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS



As imagens 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representam células mantidas somente no meio de cultivo. As imagens 7, 8, 9, 10, 11 e 12 referem-se às células após tratamento com a fração Gb1 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As imagens 13, 14, 15, 16, 17 e 18 referem-se às células após tratamento com a fração Gb1-OS (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Aumentos: 1, 7 e 13 = 500 x. 2, 8 e 14 = 1000x. 3, 9 e 15 = 2000 x. 4, 10 e 16 = 4000x. 5, 11 e 17 = 8000x. 6, 12 e 18 = 16000x. Esses resultados representam triplicatas biológicas.

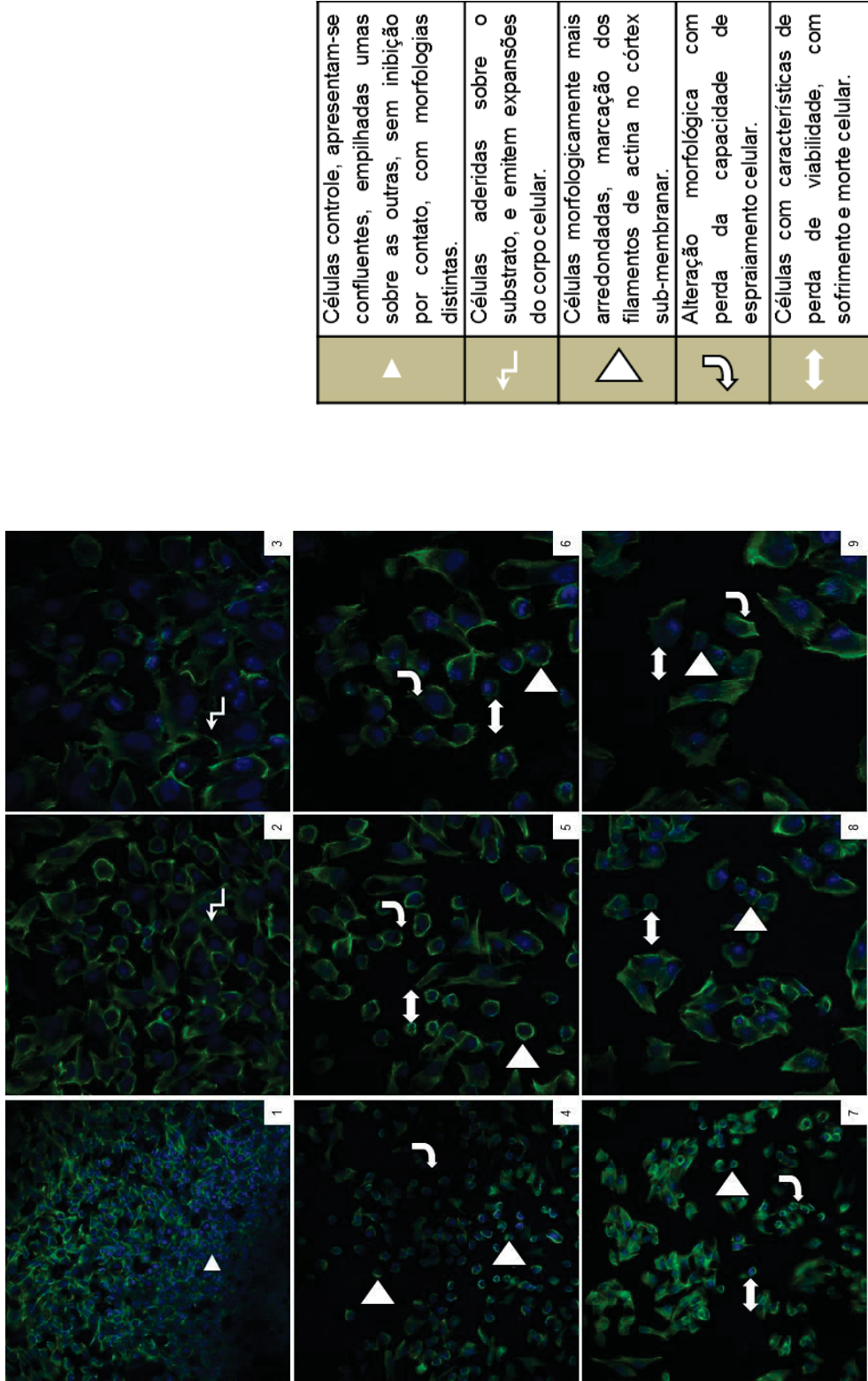
4.6.2.6 Análise morfológica de células de melanoma humano (WM9) por microscopia confocal de imunofluorescência

As imagens 1, 2 e 3 (FIGURA 55) evidenciam células controle, mantidas somente em presença de meio por um período de 72 horas. Os microfilamentos de actina foram detectados empregando marcação com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488, e os núcleos das células foram detectados através da marcação com DAPI. Pode-se observar que estas células apresentam morfologias distintas, tendem a ser hexagonais. Aderem e espraiam por sobre o substrato, não respeitam a inibição por contato, empilhando-se umas sobre as outras. Em maior magnitude (imagens 2 e 3, FIGURA 55), podemos observar que estas células apresentam expansão do corpo celular, observado através da nítida marcação positiva para os microfilamentos de actina. O núcleo destas células apresenta-se central.

De forma evidente, nas imagens 4, 5 e 6 (FIGURA 55) é possível observar que as células expostas à fração Gb1 estão em menor número quando comparadas com as células controle. Observa-se ainda um predomínio de células com morfologia arredondada. A proporção de corpo celular e volume ocupado pelo núcleo celular são muito semelhantes. Esta característica morfológica evidencia que as células estão perdendo a capacidade de espraar sobre o substrato. Em muitas das células não se observa marcação positiva para as características fibras de estresse formadas pelos microfilamentos de actina, apenas há marcação positiva intensa no córtex sub-membranar. As células, por estarem em menor número, apresentam-se em subconfluência.

Estas mesmas características, de forma mais intensa, podem ser observadas nas imagens 7, 8 e 9 (FIGURA 55) para as células expostas à fração Gb1-OS. Observa-se ainda menor número de células quando comparado com as células tratadas com Gb1, e há maior espaçamento celular. As células também perdem a capacidade de adesão e espraio ao substrato, e as poucas células que estão aderidas e espraídas apresentam morfologia alterada, característico de células em processo de morte celular.

FIGURA 55 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO (WM9) EXPOSTAS AOS POLISSACARÍDEOS Gb1 E Gb1-OS POR 72 HORAS



As imagens 1, 2 e 3 representam células mantidas somente no meio de cultivo. As imagens 4, 5 e 6 referem-se às células após tratamento com a fração Gb1 (100 µg.mL⁻¹). As imagens 7, 8 e 9 referem-se às células após tratamento com a fração Gb1-OS (100 µg.mL⁻¹). Aumentos: 1, 4 e 7 = 200 x. 2, 5 e 8 = 400x. 3, 6 e 9 = 600x. Esses resultados representam triplicatas biológicas.

4.6.2.7 Determinação dos níveis de espécies reativas do oxigênio

Células de melanoma foram avaliadas quanto aos níveis de espécies reativas do oxigênio (ROS) frente ao tratamento com as frações Gb1 e Gb1-OS por 72 horas. Como controle positivo de produção de ROS foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A FIGURA 56 mostra que nenhuma das frações alterou os níveis de ROS pelas células WM9, sugerindo que estes polissacarídeos não atuam por este mecanismo.

FIGURA 56 NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 72 HORAS

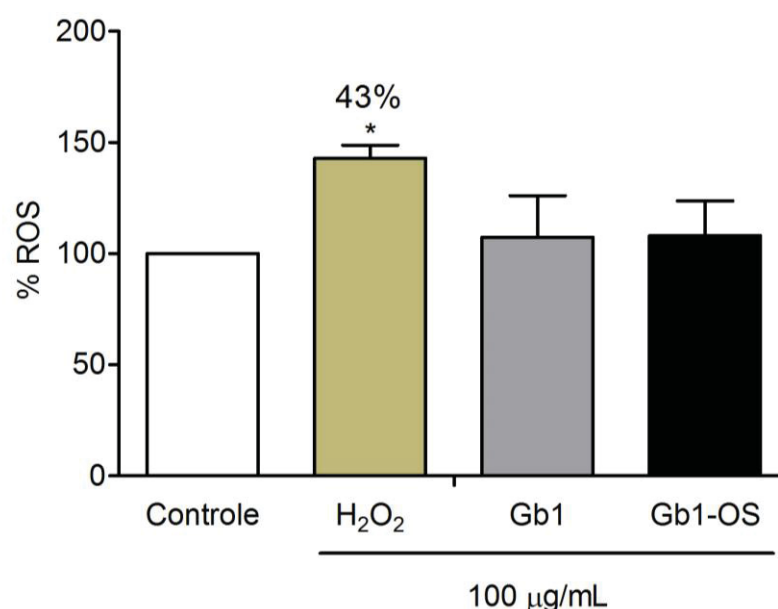


Gráfico representativo de 3 experimentos independentes feitos em sextuplicata. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4.6.2.8 Avaliação da migração celular

Uma das características de células tumorais é a capacidade de migração e metástase. Desta forma, a migração de células WM9 foi avaliada após o tratamento com os polissacarídeos Gb1 e Gb1-OS. Para isto, as células foram plaqueadas até atingir confluência, e os tratamentos com polissacarídeo foram realizados imediatamente após ser retirada uma camada de células, de forma a se obter uma

lacuna entre a população de células. A migração das células adjacentes em direção ao risco foi observada ao microscópio e a medida da distância da lacuna foi obtida através do software ImageJ. O experimento foi acompanhado imediatamente após o tratamento (tempo 0 hora), e por 24 e 48 horas após o tratamento.

Foi possível observar na FIGURA 57 que a distância da lacuna das células controle diminuiu, indicando que as células migraram em direção ao centro da lacuna com tendência a fechá-lo. A fração Gb1 apresenta uma tendência em inibir a migração celular, apesar deste resultado não ser estatisticamente significativo. Já a fração Gb1-OS inibiu significativamente a migração celular nos tempos de 24 e 48 horas, com uma diferença de aproximadamente 120 μm e 150 μm em relação aos controles de 24 e 48 horas. Estes resultados indicam que a fração oversulfatada Gb1-OS possui potencial de inibir a migração de células de melanoma humano WM9.

FIGURA 57 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE *Scratch in vitro* APÓS TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES Gb1 e Gb1-OS POR 0, 24 E 48 HORAS

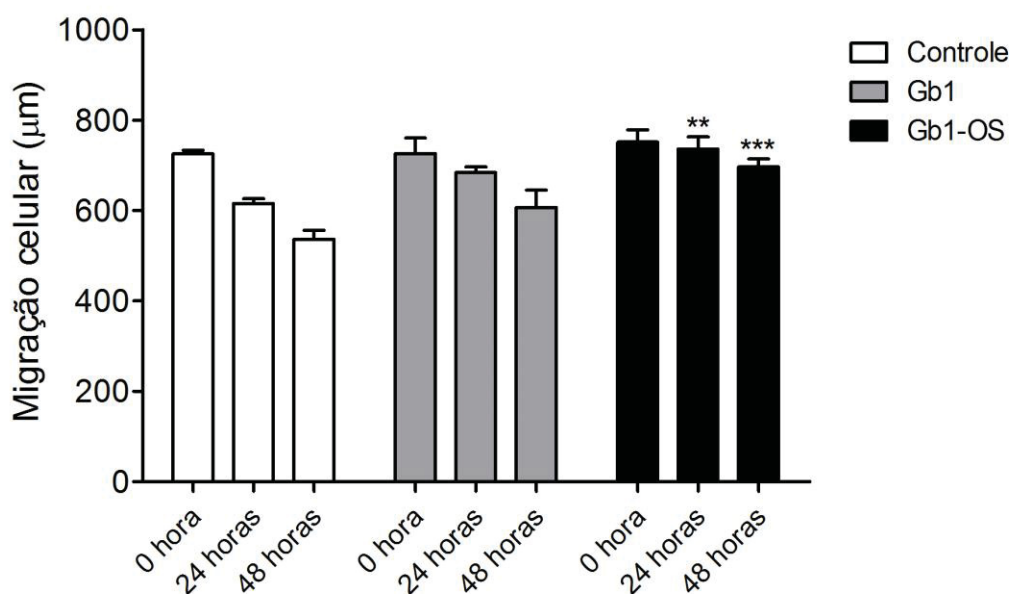


Gráfico representativo de 3 experimentos independentes feitos em triplicatas. A significância estatística mostrada é referente à condição controle (ANOVA seguido de teste Tukey: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Uma xilofucoglucuronana sulfatada extraída da alga parda *Ascophyllum nodosum*, denominada comumente como ascofilana, foi avaliada *in vitro* quanto ao seu potencial citotóxico e de inibição da migração, adesão e invasão de células de

melanoma B16. Este polissacarídeo não apresentou citotoxicidade pelos métodos do MTT em concentrações até 1 mg.mL^{-1} , entretanto, inibiu a migração celular de forma concentração-dependente. Ainda, inibiu a adesão das células B16 ao colágeno tipo I em 47%, 62% e 69% nas concentrações de 10, 100 e $1000 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os níveis de N-caderina (marcador mesenquimal) foram significativamente diminuídos e os de E-caderina (marcador epitelial) parcialmente aumentados. Além disto, o polissacarídeo nas concentrações de 5, 10 e $20 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ diminuíram a invasão das células B16 no Matrigel em 57%, 67% e 78%, respectivamente. Os níveis da metaloproteinase de matriz MMP-9 foram inibidos de forma concentração-dependente. Uma vez avaliados os efeitos da ascofilana *in vitro*, foi avaliado o potencial anti-metastático em camundongos. Células de melanoma foram injetadas nos animais via intravenosa e o polissacarídeo (25 mg.kg^{-1}) foi administrado via intraperitoneal. Após o período de tratamento e observação, os animais foram sacrificados e foi observada redução significativa do número de colônias metastáticas na superfície dos pulmões dos animais tratados com o polissacarídeo, em comparação com os animais controle. Os autores sugerem que a ascofilana apresenta inibição da migração, adesão e invasão celular, além de potencial anti-metastático (ABU *et al.*, 2015).

Adicionalmente, fucoidanas nativas e oversulfatadas obtidas de *Fucus vesiculosus* reduziram significativamente a proliferação de células endoteliais HUVEC. Porém, a concentração de fucoidana oversulfatada necessária para reduzir 35% da proliferação foi $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto de fucoidana nativa foi de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. O polissacarídeo oversulfatado ($100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiu a migração celular em aproximadamente 40%, através da inibição da ligação do VEGF ao receptor celular, entretanto, não apresentou toxicidade em células de melanoma B16 através do teste de MTT (KOYANAGI *et al.*, 2003).

Neste trabalho, a fração Gb1-OS foi capaz de inibir significativamente a migração celular de células de melanoma humano WM9. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar por qual mecanismo ela atua.

4.6.3 Comparação dos efeitos citotóxicos de Gb1 e Gb1-OS em células tumorais humanas de glioblastoma (linhagem U87MG) e melanoma metastático (linhagem WM9)

Com a finalidade de comparar os resultados de atividade biológica obtidos para as linhagens celulares U87MG e WM9 após o tratamento com as heteroramnanas sulfatadas Gb1 e Gb1-OS, os resultados foram compilados na TABELA 21.

Em relação à fração Gb1, observa-se que esta inibiu a atividade metabólica de células U87MG, avaliada pelo método do MTT (58%), assim como inibiu a capacidade celular de incorporação do vermelho neutro (43%). Este efeito veio acompanhado do aumento da porcentagem de células na fase G₁ do ciclo celular (13,6%) e aumento da porcentagem de células marcadas com anexina (13,4%), entretanto, com ausência de DNA fragmentado. Estes resultados sugerem que aproximadamente 50% das células U87MG apresentam metabolismo comprometido, acompanhado de um efeito antiproliferativo e início do processo de morte celular por apoptose (exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática sem ruptura da membrana e sem fragmentação do DNA). Corroborando com estes resultados, as análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia confocal mostraram que as células U87MG tem morfologia alterada quando tratadas com a fração Gb1, apresentando menor número de células.

Quando o mesmo tratamento foi realizado em células da linhagem WM9, a inibição da atividade metabólica e da incorporação do vermelho neutro foi menos intensa (15 e 13,8%, respectivamente), entretanto, foi observada presença de DNA fragmentado (8%) e aumento da porcentagem de células marcadas com anexina e duplamente marcadas (10 e 3,4%, respectivamente), sugerindo que o processo de morte celular por apoptose foi mais intenso nesta linhagem celular. Corroborando com estes resultados, as análises morfológicas das células WM9 evidenciaram perda do número de células, com alterações características de células apoptóticas.

A fração Gb1-OS mostrou-se mais citotóxica e efetiva em ambos os modelos. De forma interessante, Gb1-OS parece promover apoptose de forma mais pronunciada nas células U87MG, observado pela maior proporção de células marcadas com anexina (12%, $p < 0,001$) quando comparadas às células WM9 (6%).

Além disto, a porcentagem de DNA fragmentado nas células U87MG é maior (54%, $p < 0,001$). Corroborando com estes resultados, as análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal, realizadas com as duas linhagens celulares, mostra que a fração Gb1-OS induziu maior comprometimento morfológico, com predomínio de *debris* celulares e poucas células aderidas ao substrato, indicando maior susceptibilidade das células a este composto, em comparação com o tratamento com a fração Gb1. Mesmo com nítida redução do número das células WM9 após tratamento com Gb1-OS, observa-se que as poucas células que permaneceram aderidas apresentam morfologia arredondada e com nítida redução da expansão do corpo celular, características estas não mais evidentes para as células U87MG. Estes resultados comprovam que as células U87MG foram mais afetadas morfolologicamente após o tratamento com Gb1-OS quando comparadas com as células WM9.

TABELA 21 – COMPARAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS SOBRE CÉLULAS U87MG E WM9

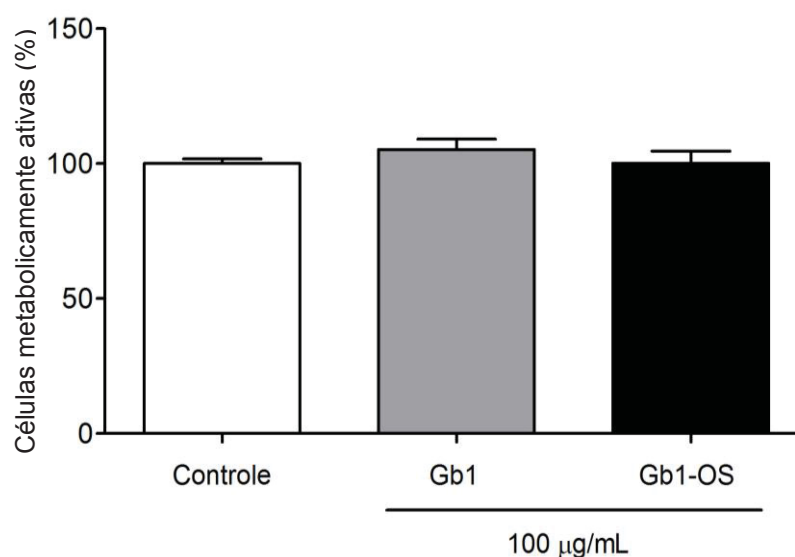
Processo avaliado	Fração Gb1		Fração Gb1-OS	
	U87MG	WM9	U87MG	WM9
Atividade metabólica (MTT)	↓ 58%	↓ 15%	↓ 74%	↓ 34%
Capacidade de incorporação do vermelho neutro (VN)	↓ 43%	↓ 13,8%	↓ 53%	↓ 14,3%
Distribuição de células no ciclo celular	↑ células em G ₁ (13,6%)	-	↓ células em G ₁ (26,7%) ↑ células em S (15,3%) ↑ células em G ₂ (11,4%)	-
Porcentagem de DNA fragmentado	-	↑ 6%	↑ 54%	↑ 31%
Porcentagem de células marcadas com anexina e iodeto de propídeo	↓ células viáveis (12,5%) ↑ anexina (13,4%)	↓ células viáveis (15%) ↑ anexina (10%) ↑ anexina/PI (3,4%)	↓ células viáveis (24,8%) ↑ anexina (12%) ↑ anexina/PI (9,9%)	↓ células viáveis (17%) ↑ anexina (6%) ↑ anexina/PI (7,1%)

4.6.4 Efeito citotóxico das heteroramnanas nativas e quimicamente modificadas em células normais de fibroblasto humano (MRC-5)

A fim de verificar se os polissacarídeos nativos e modificados de *G. brasiliensis* apresentam citotoxicidade em células normais, foi realizado um ensaio de MTT com células humanas normais de fibroblasto (linhagem MRC-5).

As células MRC-5 foram tratadas com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ das frações Gb1 e Gb1-OS por 72 h, e avaliadas quanto à atividade metabólica pelo ensaio do MTT. Como pode ser observado na FIGURA 58, nenhuma fração apresentou citotoxicidade para as células normais de fibroblasto humano. Estes resultados tornam-se interessantes a partir do momento em que os polissacarídeos sulfatados nativos e modificados quimicamente, na concentração e tempo testados, não são citotóxicos para células normais, mas apresentam citotoxicidade em células tumorais. Sendo assim, representam compostos promissores para estudos futuros na busca de novas drogas que apresentem eficácia no tratamento, e o mínimo efeito adverso possível para as células normais do organismo.

FIGURA 58 EFEITO CITOTÓXICO DAS FRAÇÕES Gb1 E Gb1-OS NA LINHAGEM NORMAL DE FIBROBLASTO HUMANO (MRC-5) APÓS TRATAMENTO POR 72 HORAS



Avaliação da citotoxicidade de células MRC-5 (Ensaio de MTT) após o tratamento com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo no tempo de 72 horas de exposição. A condição controle foi representada como 100% de células coradas. Os dados mostrados são relativos a 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata.

5 RESUMO DOS RESULTADOS

- A macroalga verde *Gayralia brasiliensis* sintetiza heteroramnanas sulfatadas como principal polissacarídeo solúvel em meio aquoso.
- O padrão estrutural determinado por métodos químicos e espectroscópicos das heteroramnanas sulfatadas constituintes do extrato aquoso (Gb1) é similar ao da heteroramnana purificada e homogênea (Gb1r), com massa molecular de $1,371 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$.
- As heteroramnanas de *G. brasiliensis* (Gb1 e Gb1r) são constituídas principalmente por unidades de α -L-ramnose 3- e 2-ligadas, as quais estão heterogeneamente distribuídas ao longo do polímero. Estas unidades são monossulfatadas, dissulfatadas ou não substituídas por grupos O-sulfato (1,0:0,53:0,31 e 1,0:0,48:0,23, respectivamente).
- As heteroramnanas nativas de *G. brasiliensis* são parcialmente ramificadas, apresentando 1 ponto de ramificação a cada 12 unidades monossacarídicas. A heteroramnana homogênea apresenta 1 ponto de ramificação a cada 5 unidades monossacarídicas.
- Terminais não redutores de ácido β -D-glucurônico 2- e 2,4-sulfatados bem como ácidos β -D-glucurônico e β -D-galacturônico não sulfatados, são constituintes das cadeias laterais, juntamente com terminais não redutores de β -D-xilose, β -D-galactose e β -D-glucose.
- Terminais não redutores de ácido β -D-glucurônico dissulfatado e unidades de β -D-glucose 6-sulfatada foram descritos pela primeira vez para heteroramnanas sulfatadas.
- A reação de sulfatação química na presença de dimetilformamida e trióxido de enxofre-piridina foi eficaz para obtenção de uma heteroramnana com alto grau de sulfatação (1,9 vezes maior que a

fração de origem). Vale destacar que esta é a primeira descrição de sulfatação química em heteroramnanas produzidas por algas verdes.

- Análises químicas e espectroscópicas da heteroramnana oversulfatada demonstraram que a maioria das hidroxilas livres presentes na fração nativa foi substituída por grupos sulfato. As unidades de α -L-ramnose 3-ligadas e 2-ligadas apresentaram-se majoritariamente dissubstituídas, os terminais não redutores de α -L-ramnose e β -D-xilose apresentaram-se trissubstituídos e parte dos terminais não redutores de β -D-glucose apresentaram-se tetrassubstituídos. Adicionalmente, as unidades de β -D-xilose 3- e 4-ligadas foram dissulfatadas, e os pontos de ramificação de β -D-galactose 3,4-dissubstituídos foram sulfatados em C-2 e C-6. As unidades de β -D-glucose 4-ligadas foram parcialmente sulfatadas em C-2, C-3 e C-6, e as unidades de β -D-glucose 4-ligadas naturalmente sulfatadas em C-6 foram sulfatadas em C-2 e C-3.
- As heteroramnanas nativas e modificadas por sulfatação química ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram ação citotóxica em células tumorais humanas de glioblastoma (linhagem U87MG) e melanoma metastático (linhagem WM9). Adicionalmente, são desprovidas de atividade citotóxica em células normais de fibroblasto humano (linhagem MRC-5).
- Em modelo de glioblastoma humano (linhagem U87MG), a heteroramnana nativa reduz a viabilidade celular, aumenta a porcentagem de células na fase G_1 do ciclo celular, bem como possivelmente induz apoptose sem perda da integridade de membrana e sem presença de DNA fragmentado. A heteroramnana oversulfatada também apresenta citotoxicidade através de possível mecanismo de apoptose, mas com perda da integridade da membrana e com presença de DNA fragmentado em grande proporção.
- Em modelo de melanoma metastático humano (linhagem WM9), a heteroramnana nativa induz morte celular por mecanismo de apoptose,

com baixa proporção de DNA fragmentado e indução da expressão de caspase 3 ativa. A heteroramnana oversulfatada induz morte celular por mecanismo de apoptose, com perda da integridade de membrana, alta proporção de DNA fragmentado e indução da expressão de caspase 3 ativa, além de inibir significativamente a migração celular. Nenhum dos polissacarídeos altera os níveis de espécies reativas do oxigênio.

- A heteroramnana oversulfatada foi mais citotóxica do que a heteroramnana nativa em células tumorais humanas de glioblastoma e melanoma metastático. O efeito potencializado da fração oversulfatada foi atribuído pelo menos em parte à maior porcentagem de unidades monossacarídicas dissulfatadas e trissulfatadas.

6 CONCLUSÕES

1. No presente trabalho análises químicas e espectroscópicas demonstraram que a alga verde *Gayralia brasiliensis* sintetiza heteroramnanas sulfatadas como principal polissacarídeo solúvel em meio aquoso.

2. As heteroramnanas de *G. brasiliensis* são parcialmente ramificadas e constituídas principalmente por unidades de α -L-ramnose 3- e 2-ligadas, as quais estão majoritariamente monosulfatadas e dissulfatadas. Outros monossacarídeos neutros (xilose, galactose e glucose), assim como ácidos urônicos (glucurônico e galacturônico) são constituintes destes polissacarídeos sulfatados.

3. Terminais não redutores de ácido β -D-glucurônico dissulfatado e unidades de β -D-glucose 6-sulfatada 4-ligadas foram descritos pela primeira vez para heteroramnanas sulfatadas.

4. As heteroramnanas sulfatadas nativas foram modificadas quimicamente através de sulfatação química originando um produto oversulfatado com estrutura química inédita.

5. Tanto as heteroramnanas nativas como as oversulfatadas apresentaram citotoxicidade em células tumorais humanas (glioblastoma linhagem U87MG e melanoma linhagem WM9).

6. As heteroramnanas nativas e oversulfatadas são desprovidas de atividade citotóxica em células humanas normais (fibroblasto) na concentração utilizada ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

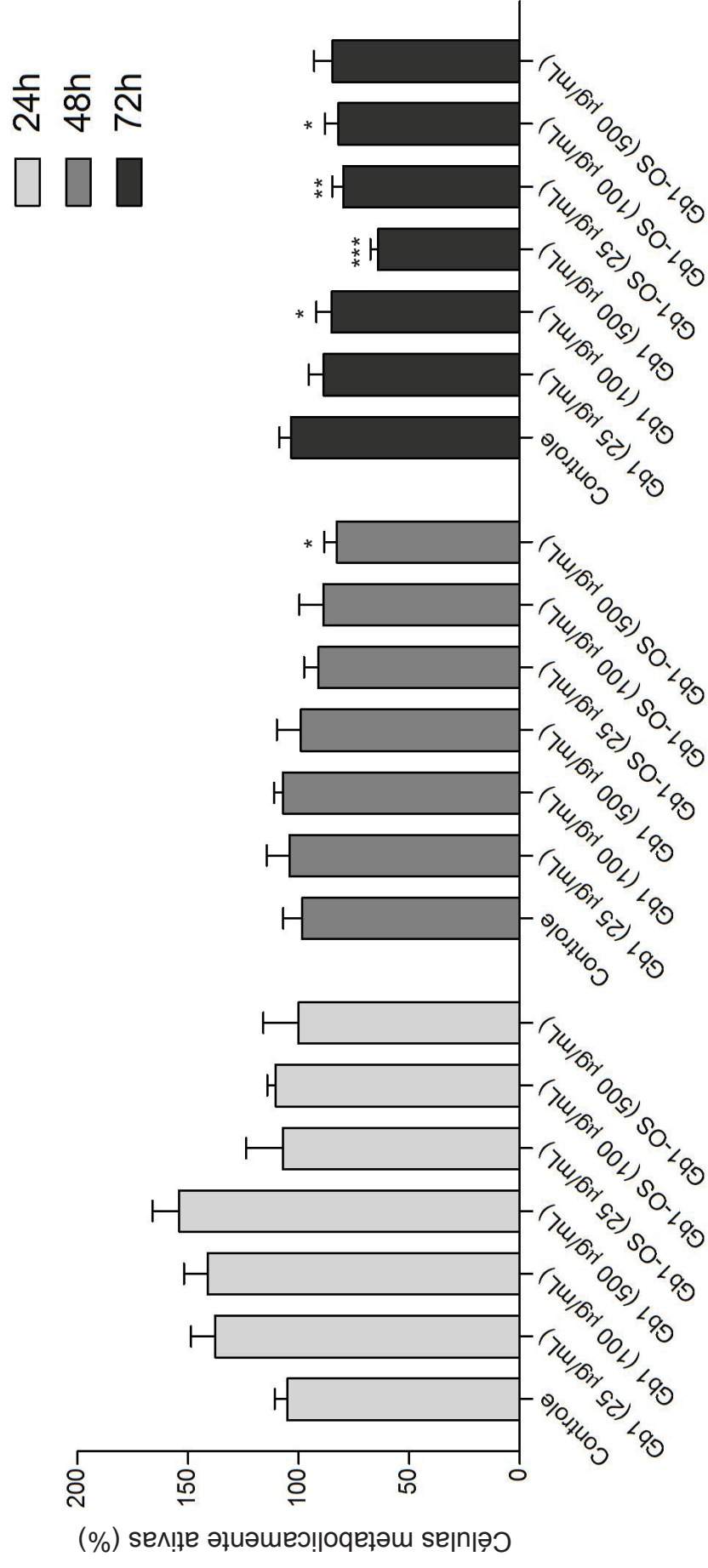
7. Os resultados obtidos com as heteroramnanas nativas e oversulfatadas em modelo de glioblastoma e de melanoma indicam que estes polissacarídeos induzem a morte celular por mecanismo de apoptose.

8. A heteroramnana oversulfatada inibe significativamente a migração celular quando avaliada frente ao modelo de melanoma.

9. Tanto a heteroramnana nativa como a oversulfatada não alteram os níveis de espécies reativas do oxigênio nas células de melanoma.

10. A maior citotoxicidade da heteroramnana oversulfatada em relação à nativa foi correlacionada com a maior porcentagem de unidades monossacarídicas dissulfatadas e trissulfatadas.

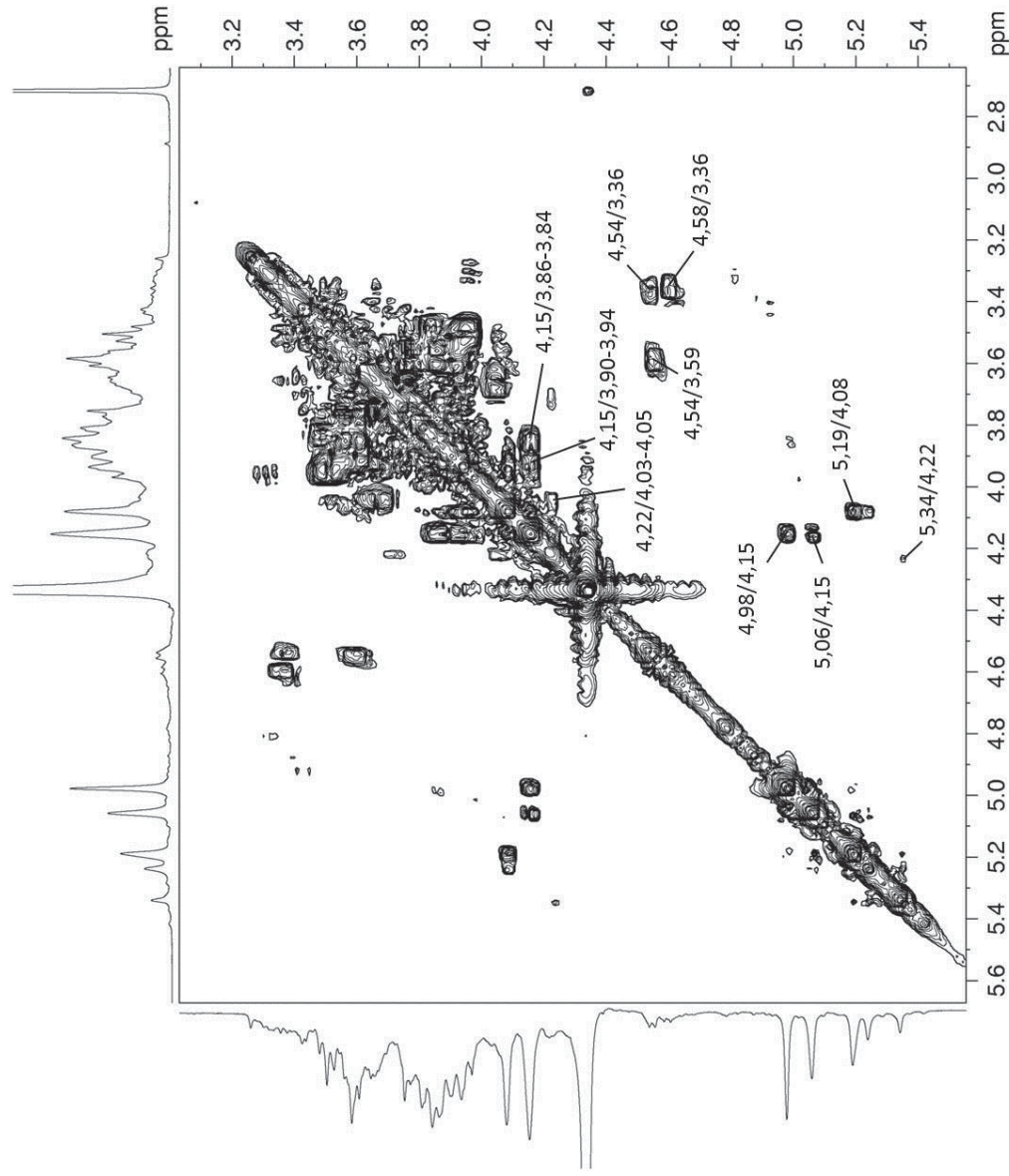
ANEXO I



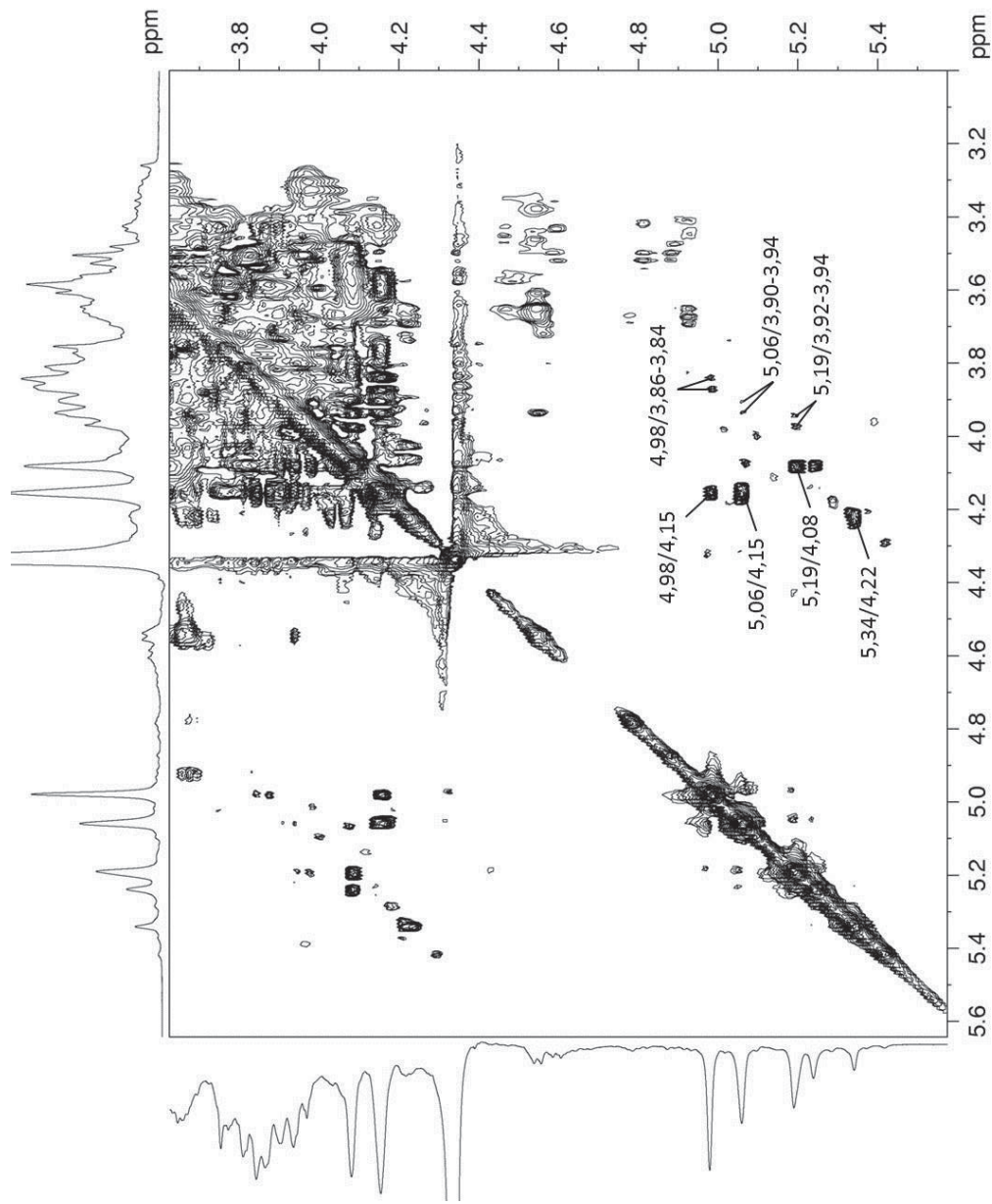
Avaliação da citotoxicidade de células MDA-MB 231 (Ensaio de MTT) após o tratamento com 25, 100 ou 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de polissacarídeo nos tempos de 24, 48 e 72 horas de exposição. A condição controle foi representada como 100% de células coradas. Os dados mostrados são relativos a 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata.

ANEXO II

Espectro bidimensional de COSY da fração Gb1-RD



Solvente: D₂O. Temperatura: 70°C. Acetona como padrão interno: 2,225 ppm.

ANEXO III**Espectro bidimensional de TOCSY da fração Gb1-RD**

Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 2,225 ppm.

REFERÊNCIAS

- ABILDGAARD, C.; GULDBERG, P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. **Trends in Molecular Medicine**. v. 21, n. 3, p. 164-171, 2015.
- ABTA (2017). Glioblastoma and Malignant Astrocytoma. ASSOCIATION, A. B. T.
- ABU, R.; JIANG, Z.; UENO, M.; ISAKA, S.; NAKAZONO, S.; OKIMURA, T.; CHO, K.; YAMAGUCHI, K.; KIM, D.; ODA, T. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 458, n. p. 727-732, 2015.
- AHMED, O. M.; AHMED, R. R. Anti-proliferative and apoptotic efficacies of ulvan polysaccharides against different types of carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cancer Science and Therapy**. v. 6, n. p. 202-208, 2014.
- AL-HORANI, R. A.; DESAI, U. R. Chemical sulfation of small molecules - advances and challenges. **Tetrahedron**. v. 66, n. p. 2907-2918, 2010.
- ALE, M. T.; MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 49, n. p. 331-336, 2011.
- ALE, M. T.; MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 *in vitro*. **Marine Drugs**. v. 9, n. p. 2605-2621, 2011.
- ALLEN, N. J.; EROGLU, C. Cell biology of astrocyte-synapse interactions. **Neuron**. v. 96, n. p. 697-708, 2017.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. *In vitro* cytotoxicity assessment of ulvan, a polysaccharide extracted from green algae. **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 8, p. 1143-1148, 2012.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. **Journal of Applied Phycology**. v. 25, n. p. 407-424, 2013.
- ANDERSON, M. A.; STONE, B. A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 5, n. p. 115-129, 1985.

ARAÚJO, C. A. D.; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T. R.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**. v. 91, n. p. 483-491, 2013.

ARELLANO, M.; MORENO, S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 29, n. 4, p. 559-573, 1997.

ARORA, D.; SHARMA, P. K.; SIDDIQUI, M. H.; SHUKLA, Y. Necroptosis: Modules and molecular switches with therapeutic implications. **Biochimie**. v. n. p. 2017.

BACKINOWSKY, L. V.; BALAN, N. F.; SHASHKOV, A. S.; KOCHETKOV, N. K. Synthesis and ^{13}C -n.m.r. spectra of β -L-rhamnopyranosides. **Carbohydrate Research**. v. 84, n. 2, p. 225-235, 1980.

BEMILLER, J. N. Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry** v. 22, n. p. 25-108, 1967.

BERTÉ, S. D. **Heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas quimicamente obtidas da macroalga verde *Gayralia brasiliensis*: Estrutura química e atividades biológicas**. Doutorado. Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - Universidade Federal do Paraná, 2013.

BIRKINSHAW, R. W.; CZABOTAR, P. E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 72, n. p. 152-162, 2017.

BLANPAIN, C. Tracing the cellular origin of cancer. **Nature Cell Biology**. v. 15, n. 2, p. 126-134, 2013.

BLOCH, O.; SAFAEE, M.; SUN, M. Z.; BUTOWSKI, N. A.; MCDERMOTT, M. W.; BERGER, M. S.; AGHI, M. K.; PARSA, A. T. Disseminated progression of glioblastoma after treatment with bevacizumab. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 115, n. p. 1795-1801, 2013.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**. v. 9, n. 1, p. 7-9, 1984.

BRADING, J. W. E.; GEORG-PLANT, M. M. T.; HARDY, D. M. The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. **Journal of the Chemical Society**. v. n. p. 319-324, 1954.

CARLSON, J. A.; LINETTE, G. P.; APLIN, A.; NG, B.; SLOMINSKI, A. Melanocyte Receptors: Clinical Implications and Therapeutic Relevance. **Dermatologic Clinics**. v. 25, n. p. 541-557, 2007.

CASSOLATO, J. E. F. **Determinação da estrutura química e atividade biológica de heteroramnanas sulfatadas obtidas de macroalgas verdes (Ulvaes -**

Chlorophyta). Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

CHAN, C. X.; HO, C. L.; PHANG, S. M. Trends in seaweed research. **Trends in Plant Science**. v. 11, n. 4, p. 165-166, 2006.

CHICO, J. F.; SAGGAU, C.; ADAM, D. Proteolytic control of regulated necrosis. **BBA - Molecular Cell Research**. v. 1864, n. 11, p. 2147-2161, 2017.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; VIZCARGÜÉNAGA, M. I.; KASULIN, L.; DIOS, A. D.; ESTEVEZ, J. M.; CEREZO, A. S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 41, n. p. 641-649, 2007.

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

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. The cell cycle and cancer. **PNAS**. v. 94, n. p. 2776-2778, 1997.

COLQUHOUN, A. Cell biology-metabolic crosstalk in glioma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 89, n. p. 171-181, 2017.

DANIELS, B. A. (2005). Seaweed extract composition for treatment of inflammation. Oklahoma City, US. **US 20050196410A1**.

DANIELS, B. A. (2007). Seaweed extract composition for treatment of diabetes and diabetic complications. Oklahoma City, US. **US 20070082868A1**.

DANIELS, B. A. (2007). Stent for delivery of drugs to the endothelium. Oklahoma City, US. **US0072143 83B2**.

DE CARVALHO, M. M. **Heteroramnanas sulfatadas obtidas de *Gayralia oxysperma*: investigação do mecanismo de atividade antitumoral e caracterização química dos produtos de degradação parcial**. Mestre. Ciências (Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2013.

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

DIAZ-MORALLI, S.; TARRADO-CASTELLARNAU, M.; MIRANDA, A.; CASCANTE, M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 138, n. p. 255-271, 2013.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**. v. 84, n. p. 106-110, 1962.

DOMOZYCH, D. S.; CIANCIA, M.; FANGEL, J. U.; MIKKELSEN, M. D.; ULVSKOV, P.; WILLATS, W. G. T. The cell walls of green algae. **Frontiers in Plant Science**. v. 3, n. p. 1-7, 2012.

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

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EISELE, G.; WELLER, M. Targeting apoptosis pathways in glioblastoma. **Cancer Letters**. v. 332, n. p. 335-345, 2013.

ELLATEF, G. E. F. A.; AHMED, O. M.; REHEIM, E. S. A.; Z., A. H.; HAMID, A. *Ulva lactuca* polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation. **Breast Cancer - Targets and Therapy**. v. 9, n. p. 67-83, 2017.

FEDONENKO, Y. P.; KONNOVA, O. N.; ZDOROVENKO, E. L.; KONNOVA, S. A.; ZATONSKY, G. V.; SHASHKOV, A. S.; IGNATOVA, V. V.; KNIREL, Y. A. Structural analysis of the O-polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* S17. **Carbohydrate Research**. v. 343, n. p. 810-816, 2008.

FERNÁNDEZ, P. V.; ESTEVEZ, J. M.; CEREZO, A. S.; CIANCIA, M. Sulfated B-D-mannan from green seaweed *Codium vermilara*. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, n. p. 916-919, 2012.

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

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**. v. 160, n. p. 171-177, 2006.

GAMAL, A. A. E. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 18, n. p. 1-25, 2010.

GHOSH, A. P.; ROTH, K. A. Detection of apoptosis and autophagy. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**. v. n. p. 3841–3858, 2014.

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

GORDEZIANI, M.; ADAMIA, G.; KHATISASHVILI, G.; GIGOLASHVILI, G. Programmed cell self-liquidation (apoptosis). **Annals of Agrarian Science**. v. 15, n. p. 148-154, 2017.

HARADA, N.; MAEDA, M. Chemical structure of antithrombin-active rhamnan sulfate from *Monostroma nitidum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, n. 9, p. 1647-1652, 1998.

HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. Cdk inhibitors in development and cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**. v. 6, n. p. 56-64, 1996.

IURLARO, R.; ANNICCHIARICO, C. L. L.; MUÑOZ-PINEDO, C. (2014). Chapter 3 - Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. Methods in Enzymology. GALLUZZI, L. and KROEMER, G. **542**: 59-80.

JANG, M.; KIM, S. S.; LEE, J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 45, n. p. 1-8, 2013.

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

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; WIDMALM, G. Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of casper using ^1H - and ^{13}C -n.m.r. data. **Carbohydrate Research**. v. 188, n. p. 169-191, 1989.

JIAO, L.; LI, X.; LI, T.; JIANG, P.; ZHANG, L.; WU, M.; ZHANG, L. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. **International Immunopharmacology**. v. 9, n. p. 324-329, 2009.

JONSSON, H. **Exploring the structure of oligo- and polysaccharides: Synthesis and NMR spectroscopy studies**. Sweden, Stockholm University. US-AB, 2010.

JURATLI, T. A.; SCHACKERT, G.; KREX, D. Current status of local therapy in malignant gliomas - A clinical review of three selected approaches. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 139, n. p. 341-358, 2013.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; ROSÁRIO, M. M. T. D.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B.; CASSOLATO, J. E. F.; IACOMINI, M.;

MARTINEZ, G. R.; ROCHA, M. E. M.; CADENA, S. M. S. C.; NOLETO, G. R. Acid heteropolysaccharides with potent antileishmanial effects. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 81, n. p. 165-170, 2015.

KARNJANAPRATUM, S.; YOU, S. G. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their *in vitro* anticancer and immunomodulatory activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 48, n. p. 311-318, 2011.

KHAN, W.; RAYIRATH, U. P.; SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M. N.; RAYORATH, P.; HODGES, D. M.; CRITCHLEY, A. T.; CRAIGIE, J. A.; NORRIE, J.; PRITHIVIRAJ, B. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**. v. 28, n. p. 386-399, 2009.

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

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Molecular Cancer**. v. 9, n. 135, p. 1-14, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAHAYE, M. NMR spectroscopy characterisation of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydrate Research**. v. 314, n. p. 1-12, 1998.

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

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

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta) - NMR analysis of ulvan oligosaccharides. **Carbohydrate Research**. v. 283, n. p. 161-173, 1996.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.

LALAOUI, N.; LINDQVIST, L. M.; SANDOW, J. J.; EKERT, P. G. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 39, n. p. 63-69, 2015.

LANG, D.; MASCARENHAS, J. B.; SHEA, C. R. Melanocytes, melanocyte stem cells, and melanoma stem cells. **Clinics in Dermatology**. v. 31, n. p. 166-178, 2013.

LARM, O.; LARSSON, K.; SCHOLANDER, E. The preparation of a heparin analogue from alginic acid. **Carbohydrate Research**. v. 73, n. p. 332-336, 1979.

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

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

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

LEE, J. B.; YAMAGAKI, T.; MAEDA, M.; NAKANISHI, H. Rhamnan sulfate from cell walls of *Monostroma latissimum*. **Phytochemistry**. v. 48, n. 6, p. 921-925, 1998.

LEE, R. E. **Phycology**. New York, United States of America. Cambridge University Press, 2008.

LEIRO, J. M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J. A.; LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **International Immunopharmacology**. v. 7, n. p. 879-888, 2007.

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

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

LI, H.; MAO, W.; ZHANG, X.; QI, X.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; XU, J.; ZHAO, C.; HOU, Y.; YANG, Y.; LI, N.; WANG, C. Structural characterization of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide isolated from green alga *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**. v. 85, n. p. 394-400, 2011.

LI, N.; LIU, X.; HE, X.; WANG, S.; CAO, S.; XIA, Z.; XIAN, H.; QIN, L.; MAO, W. Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. **Carbohydrate Polymers**. v. 159, n. p. 195-206, 2017.

LIANG, W.; MAO, X.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**. v. 101, n. p. 776-785, 2014.

LIPKIND, G. M.; SHASHKOV, A. S.; KNIREL, Y. A.; VINOGRADOV, E. V.; KOCHETKOV, N. K. A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of ^{13}C -n.m.r. data. **Carbohydrate Research**. v. 175, n. 1, p. 59-75, 1988.

LITTLER, D. S. **Marine plants of the Caribbean: a field guide from Florida to Brazil**. Wasington. Smithsonian Institution, 1989.

LIU, J.; KALABIS, M. F.; LI, L.; HERLYN, M. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 563, n. p. 13-21, 2014.

LIU, X.; HAO, J.; HE, X.; WANG, S.; CAO, S.; QIN, L.; MAO, W. A rhamnan-type sulfated polysaccharide with novel structure from *Monostroma angicava* Kjellm (Chlorophyta) and its bioactivity. **Carbohydrate Polymers**. v. 173, n. p. 732-748, 2017.

LOPES, N.; RAYB, S.; ESPADA, S. F.; BOMFIM, W. A.; RAY, B.; GALHARDIA, L. C. F.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWAA, C. Green seaweed *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta, Ulvaceae) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 102, n. p. 605-612, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, n. p. 265-275, 1951.

LUNDBERG, A. S.; WEINBERG, R. A. Control of the cell cycle and apoptosis. **European Journal of Cancer**. v. 35, n. 14, p. 1886-1894, 1999.

MADDIKA, S.; ANDE, S. R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K. D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. **Drug Resistance Updates**. v. 10, n. p. 13-29, 2007.

MAJMUDAR, G. (2006). Compositions of marine botanicals to provide nutrition to aging and environmentally damaged skin. US, Mary Kay Inc., Addison, TX (US). **US 7.025.966 B2**.

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

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

MCKINNEL, J. P.; PERCIVAL, E. The acid polysaccharide from the green seaweed *Ulva lactuca*. **Journal of the Chemical Society**. v. n. p. 398-399, 1962.

MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 46, n. 3, p. 267-273, 2010.

MOHAMMAD, R. M.; MUQBIL, I.; LOWE, L.; YEDJOU, C.; HSU, H. Y.; LIN, L. T.; SIEGELIN, M. D.; FIMOIGNARI, C.; KUMAR, N. B.; DOU, Q. P.; YANG, H.; SAMADI, A. K.; RUSSO, G. L.; SPAGNUOLO, C.; RAY, S. K.; CHAKRABARTI, M.; MORRE, J. D.; COLEY, H. M.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; AMEDEI, A.; NICCOLAI, E.; AMIN, A.; ASHRAF, S. S.; HELFERICH, W. G.; YANG, X.; CHEN, S.; MOHAMMED, S. I.; KEITH, W. N.; BILSLAND, A.; HALICKA, D.; NOWSHEEN, S.; AZMI, A. S. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Seminars in Cancer Biology**. v. 35, n. p. 78-103, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. p. 55-63, 1983.

MUÑOZ-PINEDO, C.; MJIYAD, N. E.; RICCI, J. E. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. **Cell Death and Disease**. v. 3, n. 1, p. 1-10, 2012.

NAGAOKA, M.; HASHIMOTO, S.; WATANABE, T.; YOKOKURA, T. (1997). Antiulcer agent and process for preparing the same. Japan, Kabushiki Kaisha Yakult Honsha. Tokyo, Japan. **US005698534A**.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **Journal of Biochemistry**. v. 86, n. 5, p. 1323-1329, 1979.

NASATTO, P. L.; NOSEDA, M. E. D.; M.D. NOSEDA; SILVEIRA, J. L. M.; PELLIZZARI, F. M. (2013). Gel de polissacarídeos de *Gayralia brasiliensis* e gel termoe estável de polissacarídeos de *Gayralia brasiliensis* complexados com íons. Patente: Privilégio de Inovação. Brasil. **Número do registro: BR1020130108170**.

NAVARRO, M. F.; SALVESEN, G. Cell division/death: Apoptosis. **Encyclopedia of Cell Biology**. v. 3, n. p. 327-334, 2016.

NIKITOVIC, D.; MYTILINAIU, M.; BERDIKI, A.; KARAMANOS, N. K.; TZANAKAKIS, G. N. Heparan sulfate proteoglycans and heparin regulate melanoma cell functions. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1840, n. p. 2471-2481, 2014.

NISHINO, T.; NAGUNO, T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. **Carbohydrate Research**. v. 229, n. p. 355-362, 1992.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Canadian Journal of Chemistry**. v. 33, n. p. 1097-1101, 1955.

OPOKU, G.; QIU, X.; DOCTOR, V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of kappa carrageenan. **Carbohydrate Polymers**. v. 65, n. p. 134-138, 2006.

PALUNCIC, J.; KOVACEVIC, Z.; JANSSON, P. J.; KALINOWSKI, D.; MERLOT, A. M.; HUANG, M. L. H.; LOK, H. C.; SAHNI, S.; LANE, D. J. R.; RICHARDSON, D. R. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1863, n. p. 770-784, 2016.

PAPY-GARCIA, D.; BARBIER-CHASSEFIÈRE, V.; ROUET, V.; KERROS, M. E.; KLOCHENDLER, C.; TOURNAIRE, M. C.; BARRITAULT, D.; CARUELLE, J. P.; PETIT, E. Nondegradative sulfation of polysaccharides. Synthesis and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. **Macromolecules**. v. 38, n. p. 4647-4654, 2005.

PEDRINI, A. G. **Macroalgas (Chlorophyta) e gramas (Magnoliophyta)**. Rio de Janeiro, 2011.

PELLIZZARI, F.; OLIVEIRA, E. C.; YOKOYA, N. S. Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**. v. 20, n. p. 75-82, 2008.

PELLIZZARI, F.; OLIVEIRA, M. C.; MEDEIROS, A. S.; YOKOYA, N. S.; OLIVEIRA, E. C. Morphology, ontogeny, and phylogenetic position of *Gayralia brasiliensis* sp. nov. (Ultrichales, Chlorophyta) from the southern coast of Brazil. **Botanica Marina**. v. 56, n. 2, p. 197-205, 2013.

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

PENG, Z.; LIU, M.; FANG, Z.; CHEN, L.; WU, J.; ZHANG, Q. In vitro antiproliferative effect of a water-soluble *Laminaria japonica* polysaccharide on human melanoma cell line A375. **Food and Chemical Toxicology**. v. 58, n. p. 56-60, 2013.

PENG, Z.; LIU, M.; FANG, Z.; WU, J.; ZHANG, Q. Composition and cytotoxicity of a novel polysaccharide from brown alga (*Laminaria japonica*). **Carbohydrate Polymers**. v. 89, n. p. 1022-1026, 2012.

PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmacological Research**. v. 48, n. p. 543-549, 2003.

PERCIVAL, E.; WOLD, J. K. The acid polysaccharides from the green seaweed *Ulva lactuca*. Part II. The site of the ester sulphate. **Journal of the Chemical Society**. v. n. p. 5459-5468, 1963.

PETIT, E.; PAPY-GARCIA, D.; MULLER, G.; COURTOIS, B.; CARUELLE, J. P.; COURTOIS, J. Controlled sulfatation of natural anionic bacterial polysaccharides can

yield agents with specific regenerating activity *in vivo*. **Biomacromolecules**. v. 5, n. p. 445-452, 2004.

PISE, N. M.; VERLECAR, X. N.; GAIKWAD, D. K.; JAGTAP, T. G. Nutraceutical properties of the marine macroalga *Gayralia oxysperma*. **Botanica Marina**. v. 55, n. 6, p. 581-589, 2012.

PITCOVSKI, J.; SHAHAR, E.; AIZENSHEINA, E.; GORODETSKY, R. Melanoma antigens and related immunological markers. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 115, n. p. 36-49, 2017.

QI, H.; HUANG, L.; LIU, X.; LIU, D.; ZHANG, Q.; LIU, S. Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Carbohydrate Polymers**. v. 87, n. p. 1637-1640, 2012.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; CHEN, R.; ZHANG, H.; NIU, X.; LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 37, n. p. 195-199, 2005.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M.; BOBIN-DUBIGEON, C. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. **Journal of Applied Phycology**. v. 9, n. p. 179-188, 1997.

RAMANA, K. S.; RAO, E. V. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Cladophora socialis*. **Phytochemistry**. v. 30, n. 1, p. 259-262, 1991.

RAO, E. V.; RAMANA, K. S. Structural studies of a polysaccharide isolated from the green seaweed *Chaetomorpha anteninna*. **Carbohydrate Research**. v. 217, n. p. 163-170, 1991.

RAO, E. V.; RAO, N. V. S. A. V. P.; RAMANA, K. S. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Spongomorpha indica*. **Phytochemistry**. v. 30, n. p. 1183-1186, 1991.

RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases. **Nature Reviews | Cancer**. v. 3, n. p. 489-501, 2003.

RAO, N. V. S. A. V. P.; RAO, E. V. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Caulerpa taxifolia*. **Phytochemistry**. v. 25, n. p. 1645-1647, 1986.

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

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

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. 2006.

ROBIC, A.; RONDEAU-MOURO, C.; SASSI, J.-F.; LERAT, Y.; LAHAYE, M. Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). **Carbohydrate Polymers**. v. 77, n. p. 206-216, 2009.

ROCHA, C. R. R.; KAJITANI, G. S.; QUINET, A.; FORTUNATO, R. S.; MENCK, C. F. M. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to temozolomide in glioma and melanoma cells. **Oncotarget**. v. 7, n. 30, p. 48081-48092, 2016.

ROPELLATTO, J. **Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de degradação parcial obtidos da macroalga verde *Gayralia oxysperma***. Mestre. Ciências (Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil, 2011.

ROPELLATO, J.; CARVALHO, M. M.; FERREIRA, L. G.; NOSEDA, M. D.; ZUCONELLI, C. R.; GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; KENSKI, J. C. N.; NASATTO, P. L.; WINNISCHOFER, S. M. B.; DUARTE, M. E. R. Sulfated heterorhamnan from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**. v. 117, n. p. 476-485, 2015.

SAGGIORO, F. P.; NEDER, L.; STÁVALE, J. N.; PAIXÃO-BECKER, A. N. P.; MALHEIROS, S. M. F.; SOARES, F. A.; PITTELLA, J. E. H.; MATIAS, C. C. M. S.; COLLI, B. O.; JR, C. G. C.; FRANCO, M. Fas, FasL, and cleaved caspases 8 and 3 in glioblastomas: A tissue microarray-based study. **Pathology - Research and Practice**. v. 210, n. p. 267-273, 2014.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**. v. 340, n. p. 731-739, 2005.

SEEDEVI, P.; MOOVENDHAN, M.; SUDHARSAN, S.; VASANTHKUMAR, S.; SRINIVASAN, A.; VAIRAMANI, S.; SHANMUGAM, A. Structural characterization and bioactivities of sulfated polysaccharide from *Monostroma oxyspermum*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 72, n. p. 1459-1465, 2015.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**. v. 2, n. p. 103-112, 2002.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Letters**. v. 357, n. 1, p. 8-42, 2015.

SOEDA, S.; KOZAKO, T.; IWATA, K.; SHIMENO, H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein

endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1497, n. p. 127-134, 2000.

STEVENSON, T. T.; FURNEAUX, R. H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydrate Research**. v. 210, n. p. 277-298, 1991.

STURM, D.; BENDER, S.; JONES, D. T. W.; LICHTER, P.; GRILL, J.; BECHER, O.; HAWKINS, C.; MAJEWSKI, J.; JONES, C.; COSTELLO, J. F.; IAVARONE, A.; ALDAPE, K.; BRENNAN, C. W.; JABADO, N.; PFISTER, S. M. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. **Nature Reviews | Cancer**. v. 14, n. p. 92-107, 2014.

SURAYOT, U.; LEE, J. H.; PARK, W. J.; YOU, S. G. Structural characteristics of polysaccharides extracted from *Cladophora glomerata* Kützinger affecting nitric oxide releasing capacity of RAW 264.7 cells. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. v. 7, n. 1, p. 26-31, 2016.

TABARSA, M.; LEE, S. J.; YOU, S. G. Structural analysis of immunostimulating sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. **Carbohydrate Research**. v. 361, n. p. 141-147, 2012.

TANAKA, S.; LOUIS, D. N.; CURRY, W. T.; BATCHELOR, T. T.; DIETRICH, J. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? . **Nature Reviews | Clinical Oncology**. v. 10, n. p. 14-26, 2013.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**. v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972.

TERUYA, T.; KONISHI, T.; UECHI, S.; TAMAKI, H.; TAKO, M. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 41, n. p. 221-226, 2007.

THANH, T. T. T.; QUACH, T. M. T.; NGUYEN, T. N.; LUONGA, D. V.; BUI, M. L.; TRAN, T. T. V. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 93, n. p. 695-702, 2016.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

USOV, A. I.; ZELINSKI, N. D. (2013). Chemical structures of algal polysaccharides. Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals DOMINGUEZ, H. UK, Woodhead Publishing Limited: 23-86.

VEHLOW, A.; CORDES, N. Invasion as target for therapy of glioblastoma multiforme. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1836, n. p. 236-244, 2013.

VISHCHUK, O. S.; ERMAKOVA, S. P.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. **Carbohydrate Research**. v. 346, n. p. 2769-2776, 2011.

VISHCHUK, O. S.; ERMAKOVA, S. P.; ZVYAGINTSEVA, T. N. The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas: Anti-tumor activity and structure-function relationship. **Food Chemistry**. v. 141, n. p. 1211-1217, 2013.

WAGNER, A. J.; FISHER, D. E. Melanocyte signaling pathways and the etiology of melanoma. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**. v. 2, n. 2, p. 179-183, 2005.

WANG, X.; ZHANG, Z.; YAO, Z.; ZHAO, M.; QI, H. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 58, n. p. 225-230, 2013.

WANG, Y.; JIANG, T. Understanding high grade glioma: Molecular mechanism, therapy and comprehensive management. **Cancer Letters**. v. 331, n. 2, p. 139-146, 2013.

WEI, N.; QUARTERMAN, J.; JIN, Y. S. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. **Trends in Biotechnology**. v. 31, n. 2, p. 70-77, 2013.

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews | Neuroscience**. v. 12, n. p. 495-508, 2011.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, n. p. 14-21, 2011.

YAACOUB, K.; PEDEUX, R.; TARTE, K.; GUILLAUDEUX, T. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. **Cancer Letters**. v. 378, n. p. 150-159, 2016.

YAMADA, T.; OGAMO, A.; SAITO, T.; WATANABE, J.; UCHIYAMA, H.; NAKAGAWA, Y. Preparation and anti-HIV activity of low-molecular-weight carrageenans and their sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**. v. 32, n. p. 51-55, 1997.

YANG, L.; ZHANG, L. M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**. v. 76, n. p. 349-361, 2009.

YAO, Z.; WU, H.; ZHANG, S.; DU, Y. Enzymatic preparation of k-carrageenan oligosaccharides and their anti-angiogenic activity. **Carbohydrate Polymers**. v. 101, n. p. 359-367, 2014.

YU, S. H.; TANG, D. W.; HSIEH, H. Y.; WU, W. S.; LIN, B. X.; CHUANG, E. Y.; SUNG, H. W.; MI, F. L. Nanoparticle-induced tight-junction opening for the transport of an anti-angiogenic sulfated polysaccharide across Caco-2 cell monolayers. **Acta Biomaterialia**. v. 9, n. p. 7449-7459, 2013.

YUAN, H.; SONG, J. Preparation, structural characterization and *in vitro* antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharide fraction from *Kappaphycus striatum*. **Journal of Applied Phycology**. v. 17, n. p. 7-13, 2005.

YUAN, H.; SONG, J.; LI, X.; LI, N.; LIU, S. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of kappa-carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. **Journal of Applied Phycology**. v. 23, n. p. 59-65, 2011.

YUAN, H.; SONG, J.; ZHANG, W.; LI, X.; LI, N.; GAO, X. Antioxidant activity and cytoprotective effect of kappa-carrageenan oligosaccharides and their different derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 16, n. p. 1329-1334, 2006.

YUAN, H.; ZHANG, W.; LI, X.; LÜ, X.; LI, N.; GAO, X.; SONG, J. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of kappa-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**. v. 340, n. p. 685-692, 2005.

ZAMARAEV, A. V.; KOPEINA, G. S.; PROKHOROVA, E. A.; ZHIVOTOVSKY, B.; LAVRIK, I. N. Post-translational modification of caspases: the other side of apoptosis regulation. **Trends in Cell Biology**. v. n. p. 2017.

ZHANG, H. J.; MAO, W. J.; FANG, F.; LI, H. Y.; SUN, H. H.; CHEN, Y.; QI, X. H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**. v. 71, n. p. 428-434, 2008.

ZHANG, M.; YANG, H. Negative growth regulators of the cell cycle machinery and cancer. **Pathophysiology**. v. 16, n. p. 305-309, 2009.

ZHANG, Z.; WANG, X.; YU, S.; YIN, L.; ZHAO, M.; HAN, Z. Synthesized oversulfated and acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Enteromorpha linza* and their potential antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 49, n. p. 1012-1015, 2011.