

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HAYANNA KARLA FELIPE SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS
OBTIDAS DE CLADÓDIOS DE *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. SOBRE O SISTEMA
COMPLEMENTO HUMANO**



CURITIBA

2018

HAYANNA KARLA FELIPE SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS
OBTIDAS DE CLADÓDIOS DE *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. SOBRE O SISTEMA
COMPLEMENTO HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia)
apresentado ao Curso de Biomedicina, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Bello Baron Maurer

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente na hora da angústia e a Nossa Senhora, minha mãe amada e intercessora.

A toda minha família pelo apoio e paciência.

Ao Curso de Biomedicina da UFPR, e às pessoas com quem convivi ao longo desses quatro anos e meio. Compartilhar alegrias e risadas, dias e noites de estudo, foram a melhor experiência da minha formação acadêmica.

A professora Juliana pela atenção e paciência, pela orientação e carinho, pois essa pessoa incrível não foi só minha orientadora, mas também minha amiga. E a professora Selma pela orientação e atenção.

A todos os professores que fizeram parte da minha jornada no conhecimento e aprendizado da Biomedicina.

Aos amigos queridos pelo incentivo e grande ajuda para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu namorado amado Alexsandro, pelo apoio, pela paciência, pela ajuda e por estar ao meu lado durante essa fase tão importante de minha vida.

Agradeço ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ao Departamento de RMN e ao NUPPLAMED pela disponibilização do material necessário para as pesquisas técnicas.

Agradeço a UFPR por me proporcionar a realização do sonho de ter uma profissão.

“Entrega o teu caminho ao Senhor;
confia nEle, e Ele tudo fará.”

Salmos 37:5

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

O sistema complemento é formado por um conjunto de proteínas solúveis ou de membrana que reagem em uma cascata altamente regulada e tem várias funções como, por exemplo, defender o organismo contra microorganismos. A ativação do complemento se dá a partir de três vias: clássica, alternativa e das lectinas, as quais estão baseadas na detecção de estruturas de superfície por proteínas de reconhecimento de padrões. Polissacarídeos e glicoconjugados, como por exemplo, pectinas, arabinogalactanas, arabinogalactana-proteínas (AGPs) e polissacarídeos sulfatados têm sido descritos como compostos imunomoduladores do sistema complemento. O presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade *in vitro*, de frações polissacarídicas (nativa e modificadas por sulfatação e carboxirredução) de cladódios de *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. (palma forrageira) e do ácido péctico comercial (AP) sobre o sistema complemento humano. A fração nativa (W-OP), fração nativa dialisada (WOP-D) e a fração sulfatada (WS-OP) foram cedidas pelo professor Dr. Luciano H. Campestrini (Dep. de Bioquímica - UFSC). A fração carboxirreduzida (WC-OP) foi obtida por carboxirredução a partir da fração W-OP. As frações foram caracterizadas por técnicas colorimétricas (dosagem de carboidratos, ácido urônico e AGP), cromatográficas (HPAEC e HPSEC-RI), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^{13}C -RMN) e espectrometria de infravermelho (DRI-FT). A atividade sobre o sistema complemento foi investigada utilizando o teste hemolítico *in vitro* de fixação do complemento, utilizando eritrócitos de carneiro para via clássica e eritrócitos de coelhos para via alternativa. As atividades das frações polissacarídicas testadas foram comparadas entre si e também em relação à atividade da heparina (controle inibidor). A atividade sobre o sistema complemento foi avaliada considerando o perfil de hemólise induzida pelo sistema complemento e os valores de ICH_{50} (que representa a quantidade em μg para atingir 50% de hemólise induzida pelo complemento). Quanto menor o valor de ICH_{50} mais potente é o efeito. As frações W-OP e WS-OP na via clássica com incubação apresentaram ICH_{50} de 208,84 e de 1,673 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, enquanto a heparina apresentou ICH_{50} de 23 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Não foi possível calcular o ICH_{50} no experimento sem incubação para a fração W-OP. A fração WS-OP sem incubação apresentou ICH_{50} de 1,443 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto a heparina apresentou ICH_{50} de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Isso demonstra que a W-OP possui atividade ativadora do complemento enquanto a fração WS-OP possui atividade inibidora do complemento. As frações W-OP e WC-OP na via alternativa com incubação apresentaram ICH_{50} de 1,124 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e de 278,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, enquanto a heparina apresentou ICH_{50} de 131,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Não foi possível calcular o ICH_{50} no experimento sem incubação para essas frações. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a fração AP apresenta uma estrutura do tipo homogalacturonana e a fração W-OP é constituída por uma homogalacturonana com cadeias de galactana e arabinogalactana. Comparando as diferenças estruturais entre as frações testadas com as atividades biológicas apresentadas, pode-se destacar que a presença de grupos sulfato provoca um efeito inibidor sobre a via clássica do sistema complemento. A presença de grupos ácidos do tipo carboxílico parece ter um efeito maior sobre a via alternativa do que em relação a via clássica. Este trabalho teve o intuito de contribuir para o melhor entendimento dos aspectos estrutura-atividade de mecanismos de imunomodulação de frações polissacarídicas sobre o sistema complemento.

Palavras-chave: palma forrageira, pectina, arabinogalactana-proteína, teste de fixação do sistema complemento, imunomodulador, imunoestimulante, imunossupresor.

ABSTRACT

The complement system is formed by a set of soluble or membrane proteins that react in a highly regulated cascade that has several functions such as to defend the organism against microorganisms. Complement activation occurs from three pathways: classical, alternative and lectins, which are based on the detection of surface structures by pattern recognition proteins. Polysaccharides and glycoconjugates, such as, pectins, arabinogalactans, arabinogalactan-proteins (AGPs) and sulfated polysaccharides have been described as immunomodulatory compounds of the complement system. The objective of the present work was to investigate the *in vitro* activity of polysaccharide fractions (native and modified by sulfation and carboxyduction) of *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL cladodes. (prickly pear cactus) and commercial pectic acid (AP) on the human complement system. The native fraction (W-OP), native dialysed fraction (WOP-D) and the sulfated fraction (WS-OP) were assigned by Professor Luciano H. Campestrini (Dep. Of Biochemistry - UFSC). The carboxyduced fraction (WC-OP) was obtained by carboxyduction from the W-OP fraction. The fractions were characterized by colorimetric techniques (carbohydrate, uronic acid and AGP), chromatographic (HPAEC and HPSEC-RI), nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR) spectroscopy and infrared spectrometry (DRI-FT). The activity on the complement system was investigated using the *in vitro* hemolytic complement fixation test, using sheep erythrocytes for classical pathway and rabbit erythrocytes for alternative pathway. The activity of the polysaccharide fractions tested was compared to each other and to the activity of heparin (inhibitory control). The activity on the complement system was evaluated considering the hemolysis profile induced by the complement system and the ICH₅₀ values (which represents the concentration in µg to achieve 50% complement-induced hemolysis). The lower value of ICH₅₀ the more potent the effect. The fractions W-OP and WS-OP in the classical pathway with incubation presented ICH₅₀ of 208.84 and 1.673 µg/mL, respectively, while heparin had ICH₅₀ of 23 µg/mL. It was not possible to calculate the ICH₅₀ in the experiment without incubation for the W-OP fraction. For the non-incubating WS-OP fraction presented ICH₅₀ of 1.443 µg/mL, while heparin presented ICH₅₀ of 10 µg/mL. This demonstrates that W-OP has complement activator activity while the WS-OP fraction has complement inhibitory activity. The fractions W-OP and WC-OP in the alternative pathway with incubation presented ICH₅₀ of 1.124 µg/mL and 278.15 µg/mL, respectively, while heparin presented ICH₅₀ of 131.5 µg/mL. It was not possible to calculate the ICH₅₀ in the experiment without incubation for these fractions. From the results obtained it can be concluded that the AP fraction presents a structure of the homogalacturonana and the W-OP fraction is constituted by a homogalacturonana with chains of galactana and arabinogalactana. Comparing the structural differences between the fractions tested with the biological activities presented, it can be highlighted that the presence of sulfate groups causes an inhibitory effect on the classical pathway of the complement system. The presence of carboxylic acid groups appears to have a greater effect on the alternative pathway than on the classical pathway. This work aimed to contribute to a better understanding of the structure-activity aspects of immunomodulation mechanisms of polysaccharide fractions on the complement system.

Key-words: prickly pear cactus, pectin, arabinogalactan-protein, complement fixation test, immunomodulatory, immunostimulant, immunosupressor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Diferentes tipos de <i>Opuntia ficus-indica</i>	16
FIGURA 2: Visão geral das vias de ativação do sistema complemento	19
FIGURA 3: Esquema passo-a-passo da formação do MAC	19
FIGURA 4: Representação esquemática da estrutura das pectinas com cadeia principal formada por HG intercalada com RG-I ramificada e RG-II	26
FIGURA 5: Representação esquemática da estrutura de uma arabinogalactana tipo I (a) e arabinogalactana tipo II (b)	27
FIGURA 6: Representação da estrutura de uma AGP	28
FIGURA 7: Estrutura de (β 1 \rightarrow 3)-D-glucana com ramificações (β 1 \rightarrow 6).....	29
FIGURA 8: Estrutura de (β 1 \rightarrow 3)-D-glucana com ramificações (β 1 \rightarrow 4).....	29
FIGURA 9: Representação esquemática de possíveis estruturas químicas de mananas imunoestimulatórias	30
FIGURA 10: Estrutura das porfiranas	31
FIGURA 11: Representação da estrutura da heparina	31
FIGURA 12: Fluxograma da estratégia experimental realizada no presente trabalho.....	33
FIGURA 13: Imagem dos cladódios da palma forrageira.....	34
FIGURA 14: Esquema da extração e obtenção das frações	35
FIGURA 15: Gel de agarose com o reagente β -GlcY para a detecção de AGPs das frações	46
FIGURA 16: Perfil de eluição das frações AP (a), W-OP (b) e dos padrões GlcAp e GalAp obtido por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).....	48
FIGURA 17: Perfil de eluição da fração AP obtido pro cromatografia de exclusão estérica de alta resolução (HPSEC) utilizando o detector de índice de refração (RI)	49
FIGURA 18: Perfil de eluição detectado pelo MALLS/RI da fração W-OP	50
FIGURA 19: Espectros de infravermelho das frações AP, W-OP, WC-OP e WS-OP	51
FIGURA 20: a: Espectro parcial de ^{13}C da fração AP. b: Espectro de correlação da fração AP	54

FIGURA 21: a: Espectro parcial de ^{13}C da fração W-OP. b: Espectro de correlação da fração W-OP55

FIGURA 22: a: Espectro parcial de ^{13}C da fração WC-OP. b: Espectro de correlação da fração WC-OP56

FIGURA 23: Efeito das frações AP, W-OP, WC-OP E WS-OP de *Opuntia ficus-indica*, e da heparina sobre a hemólise induzida pela via clássica do sistema complemento. (a) e (c) com pré-incubação. (b) e (d) sem pré-incubação de 30 minutos das frações-teste com a MHS.....59

FIGURA 24: Efeito das frações W-OP e WC-OP de *Opuntia ficus-indica*, e da heparina sobre a hemólise induzida pela via alternativa do sistema complemento. (a) com pré-incubação. (b) sem pré-incubação de 30 minutos das frações-teste com a MHS62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: MOLÉCULAS ENDÓGENAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO.	22
TABELA 2: CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE IMUNOMODULADORES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO.	25
TABELA 3: CONTROLES UTILIZADOS NO ENSAIO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO.	45
TABELA 4: ANÁLISE QUÍMICA DAS DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DAS FRAÇÕES DE <i>Opuntia ficus-indica</i> E DA FRAÇÃO AP.	47
TABELA 5: ASSINALAMENTO DA ANÁLISE DE ¹³ C E DA ANÁLISE DE CORRELAÇÃO (¹ H/ ¹³ C) - HSQC DAS FRAÇÕES AP, W-OP E WC-OP.	57
TABELA 6: RELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E OS VALORES DE ICH50 DAS FRAÇÕES TESTADAS DE <i>Opuntia ficus-indica</i> , DA FRAÇÃO AP E DA HEPARINA NAS VIAS CLÁSSICA E VIA ALTERNATIVA.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AG-I – arabinogalactanas tipo I
AG-II – arabinogalactanas tipo II
AGP – arabinogalactana-proteína
AP – ácido péctico comercial
Araf – arabinose furanosídica
 ^{13}C – carbono 13
 $^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius
cm – centímetro
 CaCl_2 – cloreto de cálcio
CMC – 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida meta-*p*-toluenossulfonato
D – Denotação de estereoisômero D
 D_2O – água deuterada
DMSO – dimetilsulfóxido
DN/DC – taxa de variação do índice de refração com relação à concentração
 EDTANa_2 – ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico
EGTA – ácido etileno glicol tetracético
EROs – espécies reativas de oxigênio
g – gramas
GLC – Cromatografia líquida gasosa
Gal*p*A – ácido galacturônico pironosídica
Glc*p* – ácido glucurônico pironosídica
Gal*p* – galactose pironosídica
Glc*p* – glucose pironosídica
GPI – glicosilfosfatidilinositol
 ^1H – hidrogênio
 H_2SO_4 – ácido sulfúrico
HA – tampão via alternativa
HC – tampão via clássica
HG – homogalacturonana
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HRGP – hidroxiprolina
HSQC – Espectroscopia de ressonância bidimensional HSQC ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$)
 ICH_{50} – percentagem de inibição de hemólise
IgG – imunoglobulina tipo G
IgM – imunoglobulina tipo M
IL-6 – interleucina 6
IL-8 – interleucina 8
IL-12 – interleucina 12
INF- γ – interferon gama
IR – infravermelho
kHz – kilohertz
L – Denotação de estereoisômero L
LBP – proteína ligadora de lipopolissacarídeos

LPS – lipopolissacarídeo
MES – ácido 2-[N-morfolina]-etanossulfônico
mg – miligramas
mL – mililitros
mM – milimolar
M – molar
MAC – complexo de ataque à membrana
Mg²⁺ – magnésio
Mg²⁺ – cloreto de magnésio
MALLS – detector de espalhamento de luz laser em multiângulos
Man_p – manose piranosídica
MASPs – proteases séricas
MBL – lectina sérica ligadora de manose
MHS – mistura de soro humano
NaCl – cloreto de sódio
nm – nanômetros
NO – óxido nítrico
PCR – proteína C reativa
PRP – proteínas de reconhecimento de padrões
PRR – receptor de reconhecimento padrão
Rhap – ramnose piranosídica
RG-I – ramnogalacturonana tipo I
RG-II – ramnogalacturonana tipo II
RI – índice de refração
RMN – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional
rpm – rotações por minutos
RS – receptores *scavengers*
SO₃-Py – tróxido de enxofre-piridina
SC – sistema complemento
TNF-α – fator de necrose tumoral
TRIS – hidroximetil aminometano
XGA – xilogalacturonana
WOP-D – fração nativa dialisada
W-OP – fração nativa por extração aquosa
WS-OP – fração sulfatada
WC-OP – fração carboxirreduzida
µg – microgramas
µL – microlitros
µm – micrometros
α – Denotação da anomeridade alfa
β – Denotação da anomeridade beta
δ – delta
β-GlcY – Reagente β-Glucosil Yariv

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1.1	<i>Opuntia ficus-indica</i>	15
1.1.2	Sistema imunológico	16
1.1.3	Sistema complemento	17
1.1.3.1	Via clássica do sistema complemento	20
1.1.3.2	Via alternativa do sistema complemento	20
1.1.3.3	Via das lectinas do sistema complemento.....	20
1.1.3.4	Moléculas reguladoras do sistema complemento endógenas	21
1.1.4	Moléculas reguladoras do sistema complemento exógenas	23
1.1.4.1	Pectinas.....	25
1.1.4.2	Arabinogalactanas (AGs) e arabinogalactanas-proteínas (AGPs).....	26
1.1.4.3	Glucanas e mananas.....	28
1.1.4.4	Polissacarídeos sulfatados	30
2.	OBJETIVOS.....	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3.	JUSTIFICATIVA.....	31
4.	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	32
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1	EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES NATIVA (W-OP) E NATIVA DIALISADA (WOP-D).....	33
5.2	OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SULFATADA (WS-OP).....	35
5.3	OBTENÇÃO DA FRAÇÃO MODIFICADA POR CARBOXIRREDUÇÃO (WC-OP)	36
5.4	ANÁLISES QUÍMICAS	37
5.4.1	Dosagens colorimétricas.....	37
5.4.1.1	Dosagem de carboidrato total	37
5.4.1.2	Dosagem de ácidos urônicos.....	37
5.4.2	Dosagem de arabinogalactana-proteínas (AGP) por difusão radial em gel de agarose na presença do reagente de Yariv (β -Glucosil).....	38
5.5	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	39
5.5.1	Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD).....	39
5.5.2	Cromatografia de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALL/RI)	39
5.6	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS.....	40
5.6.1	Espectroscopia de infravermelho (DRI-FT).....	40

5.6.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN-¹³C) e de correlação (¹H/¹³C) – HSQC	40
5.7	EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS – <i>IN VITRO</i>	41
5.7.1	Teste de fixação do sistema complemento	41
5.7.2	Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro e coelho	42
5.7.3	Obtenção de soro humano	42
5.7.4	Preparo das soluções-teste utilizadas nos testes de fixação do complemento	43
5.7.5	Avaliação da capacidade hemolítica das frações	43
5.7.6	Avaliação da via clássica	44
5.7.7	Avaliação da via alternativa	44
5.7.8	Controles dos ensaios das vias do SC	44
5.7.9	Delineamento experimental e análise estatística	45
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1	DOSAGEM DE AGP	45
6.2	DOSAGENS COLORIMÉTRICAS	46
6.3	CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO URÔNICO NAS FRAÇÕES AP E W-OP POR HPAEC-PAD	47
6.4	DETERMINAÇÃO DE HOMOGENEIDADE E DA MASSA MOLECULAR DA FRAÇÃO AP POR HPSEC-MALLS/RI	49
6.5	ANÁLISES DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA DIFUSA (DRI-FT)	50
6.6	ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DO ¹³C E DE CORRELAÇÃO (¹H/¹³C) – HSQC DAS FRAÇÕES AP, W-OP E WC-OP	52
6.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIXADORA DO SISTEMA COMPLEMENTO DAS FRAÇÕES DE <i>Opuntia ficus-indica</i> E DA FRAÇÃO AP	57
7.	CONCLUSÕES	64
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	Anexos	72

1. INTRODUÇÃO

O sistema complemento (SC) é constituído por uma série de proteínas que atua na defesa do organismo contra infecções, participa na modulação do processo inflamatório e na remoção de células apoptóticas, contribuindo para a homeostase do organismo. A ativação da cascata proteolítica do SC se dá a partir de três vias: clássica, alternativa e das lectinas, que têm como resultado final a formação do complexo de ataque à membrana (*membrane attack cell*, MAC), promovendo a lise celular do organismo invasor (SKATTUM *et al.*, 2011).

Diversas condições inflamatórias e autoimunes têm sido direta ou indiretamente relacionadas às disfunções no SC, seja por uma ativação inadequada da cascata ou por alterações na expressão e função de proteínas reguladoras. Desta forma, considerando que o SC é um importante mediador do processo de inflamação, a investigação da atividade biológica de moléculas que possam modular este sistema, mais especificamente, inibir a cascata de ativação, torna-se de grande relevância terapêutica para diversas patologias. Por outro lado, a ativação do SC pode atuar em termos de imunoestimulação não específica, em situações clínicas que necessitem de um reforço adicional para o sistema imunológico como em doenças imunossupressoras (não autoimunes), nas defesas para o combate às infecções de diferentes patógenos, como por exemplo nas infecções parasitárias e na terapêutica antitumoral. Assim, dependendo do enfoque ou da situação clínica, tanto a inibição como a ativação do SC podem ser relevantes.

Os polissacarídeos, provenientes de diversas fontes como plantas, fungos e algas, têm sido descritos como compostos imunomoduladores (FERREIRA *et al.*, 2015). Imunomoduladores podem ser definidos como moléculas sintéticas ou naturais, que modificam as respostas biológicas do organismo por meio da modulação do sistema imunológico (MELIS *et al.*, 2015). Classificam-se os imunomoduladores como imunossupressores ou imunoestimuladores, em relação ao tipo de modulação, respectivamente, negativa ou positiva (ABBAS *et al.*, 2008).

Exemplos de polissacarídeos (e glicoconjugados) conhecidos como moduladores do SC incluem pectinas, arabinogalactanas, arabinogalactana-proteínas (AGPs) e polissacarídeos sulfatados (como fucoidanas e porfiranas) (YAMADA *et al.*, 1989; YU *et al.*, 2005; SEYFRIED *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2015). As características estruturais presentes nos polissacarídeos e a sua combinação, como, por exemplo, composição

monossacarídica, massa molecular, presença e características de grupos substituintes como grupos acetil e grupos sulfato, presença ou ausência de ramificações e aspectos conformacionais, podem influenciar no tipo de atividade biológica apresentada de diferentes maneiras (FERREIRA *et al.*, 2015). Por exemplo, a presença dos grupos funcionais acetil e/ou sulfato podem afetar a carga, a solubilidade e a conformação; os grupos acetil formam bolsões hidrofóbicos nos polissacarídeos e os grupos sulfato fazem com que a molécula adquira cargas negativas (FERREIRA *et al.*, 2015). Desta forma, propostas que abordem estratégias para avaliar a correlação entre as características estruturais das frações polissacarídicas testadas com o tipo de atividade biológica apresentada são relevantes.

O material vegetal escolhido para fonte das frações polissacarídicas com potencial atividade imunomoduladora foram os cladódios da espécie *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. A fração nativa (W-OP), a fração nativa dialisada (WOP-D) e a fração sulfatada (WS-OP), previamente obtidas a partir do material mencionado, foram cedidas pelo professor Luciano H. Campestrini (UFSC). A atividade sobre o SC foi investigada utilizando o teste hemolítico *in vitro* de fixação do complemento, utilizando eritrócitos de carneiro para via clássica e eritrócitos de coelhos para via alternativa. Este teste apresenta vantagens como facilidade técnica, relativo baixo custo e como ensaio *screening* para grande número de amostra (MOLLNES *et al.*, 2007).

A hipótese do presente trabalho é de que as frações polissacarídicas nativa e modificadas quimicamente dos cladódios de *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL, poderiam exercer efeito imunomodulador sobre o sistema complemento humano, sendo possíveis candidatas à utilização como fármaco no tratamento de sintomas relacionados a doenças de origem inflamatória.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 *Opuntia ficus-indica*

A *Opuntia ficus-indica* (FIGURA 1) é uma planta arbustiva e ramificada encontrada no Brasil, conhecida como palma forrageira. É formada por raiz, caules modificados (cladódios), flores e frutos (SEMEDO, 2012). Ela pertence à subfamília Opuntioideae inserida na família Cactaceae (CHOUGUI *et al.*, 2013; ASTELLO-GARCÍA *et al.*, 2015). O gênero *Opuntia* é encontrado na região do Mediterrâneo (DI LORENZO *et*

al., 2017) e é amplamente distribuído nas Américas (ASTELLO-GARCÍA *et al.*, 2015). Sua importância ecológica e econômica se apresenta no seu uso para alimentação humana (ADLI *et al.*, 2017) e como fonte importante de compostos bioativos que conferem à planta diversas utilidades farmacológicas (SEMEDO, 2012) justificando seu uso como planta medicinal devido as propriedades anti-escorbuto e anti-inflamatório (ADLI *et al.*, 2017).

Diversos compostos já foram identificados em diversas partes (sementes, casca e polpa) (CHOUGUI *et al.*, 2013) e também nos cladódios (ASTELLO-GARCÍA *et al.*, 2015) como moléculas antioxidantes, compostos fenólicos, flavonóides (CHOUGUI *et al.*, 2013; ASTELLO-GARCÍA *et al.*, 2015). Além das moléculas citadas os cladódios são ótimas fontes de fibras (PEÑA-VALDIVIA *et al.*, 2012), boas para a dieta por serem compostos hipolipidêmicos (ASTELLO-GARCÍA *et al.*, 2015).

Os cladódios (caules modificados) são particularmente ricos em polímeros de carboidratos, conhecidos como mucilagem, compostos de unidades glicosídicas de açúcar como arabinose, galactose, xilose, ramnose e ácido galacturônico (SEPÚLVEDA *et al.*, 2007). É interessante ressaltar que a composição química sofre modificações de acordo com a fase de maturidade, estação de colheita, condições ambientais, tratamento pós-colheita e tipo de espécie (CONTRERAS-PADILLA *et al.*, 2011).

A escolha da palma forrageira foi pelo seu baixo custo, o que pode ser alternativa para a redução do custo dos medicamentos.



FIGURA 1: Diferentes tipos de *Opuntia ficus-indica*. FONTE: (NHARINGO; MOYO, 2016).

1.1.2 Sistema imunológico

O sistema imunológico é responsável pelo combate de células tumorais e pela defesa do organismo contra patógenos. Ele é composto tanto por células quanto moléculas que atuam no reconhecimento específico e na eliminação de organismos invasores. A proteção contra esses invasores envolve a atuação eficiente e integrada do sistema imunológico, que consiste, didaticamente, em sistema imunológico inato e o

sistema imunológico adaptativo (EISENREICH *et al.*, 2017). Os componentes pertencentes ao sistema imunológico inato respondem de forma inespecífica e são compostos por células: monócitos, neutrófilos, basófilos, macrófagos, eosinófilos e células *natural killer*, e fatores solúveis: proteínas do sistema complemento, enzimas e proteínas de fase aguda (ABBAS *et al.*, 2008). A imunidade inata atua como a primeira linha de defesa do organismo, dando o tempo necessário para a imunidade adaptativa organizar uma resposta. Os componentes pertencentes ao sistema imunológico adaptativo atuam com alta especificidade a determinado antígeno e tem a propriedade de formar células de memória. São eles os linfócitos B e T e as imunoglobulinas (ABBAS *et al.*, 2008).

1.1.3 Sistema complemento

O SC compreende uma família de aproximadamente 30 proteínas plasmáticas e proteínas de membrana (SKATTUM *et al.*, 2011), que reagem em uma cascata altamente regulada para defender o organismo de invasores. As proteínas plasmáticas são sintetizadas principalmente nos hepatócitos e macrófagos/monócitos, enquanto que as proteínas ligadas à membrana celular são sintetizadas nas células sobre as quais estão expressas (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001). Os componentes do SC são designados pela letra C e por números (C1-C9), por letras (por exemplo, fator D) ou por nomes usuais (por exemplo, fator de restrição homólogo).

O SC é descrito como um conjunto de proteínas que promovem lise celular em bactérias e eritrócitos marcados com anticorpos (SKATTUM *et al.*, 2011) e faz uma ponte entre o sistema imunológico inato e o adaptativo (DUNKELBERGER; SONG, 2010). Por exemplo, na membrana plasmática de células B existem um complexo formado por duas (2) proteínas: CD19 (produto do gene *cluster differentiation* - CD19), que é um componente do sistema imunológico adaptativo, e CD2/CD21 (receptor do complemento tipo 2), o qual interage com fragmentos do complemento C3d (GASQUE, 2004).

O SC tem uma função importante na defesa contra bactérias, além de combater infecções fúngicas ou parasitológicas. Já na defesa contra vírus há uma pequena interação entre vírus e SC, pois alguns deles ativam a via alternativa (SKATTUM *et al.*, 2011). O SC está envolvido no combate de micro-organismos infecciosos por meio de ligação de moléculas de reconhecimento do complemento com sua subsequente ativação levando a uma variedade de eventos destinados a eliminar o agente infeccioso. A ativação do complemento se dá a partir de três (3) vias (FIGURA 2): a clássica, a

alternativa e a das lectinas, as quais estão baseadas na detecção de estruturas de superfície por proteínas de reconhecimento de padrões (PRP) (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009). A ativação resulta na geração de peptídeos bioativos [(convertase C3 e convertase C5 e seus derivados C3a e C5a (mediadores inflamatórios)] e na formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC) (FIGURA 3), o qual perfura a membrana plasmática dos invasores por meio de um poro (RICKLIN; LAMBRIS, 2007; CARROLL; SIM, 2011), levando à morte celular por fluxo osmótico (BAYLY-JONES; BUBECK; DUNSTONE, 2017). Assim, a ativação da cascata proteolítica leva à identificação e à interação com os antígenos de superfície identificados como estranhos e permite mecanismos de contenção e controle, com a finalidade de remoção dos patógenos invasores. Por realizar estas funções, o SC representa uma parte essencial no sistema de defesa contra a infecção e fornece uma barreira inicial frente aos patógenos invasores (LAMBRIS; RICKLIN; GEISBRECHT, 2008).

O SC também atua na preservação da homeostase imunológica por meio da regulação de genes, controle da apoptose e da autofagia, interação com sistema fibrinolítico e na coagulação (AMARA *et al.*, 2010), pois faz agregação plaquetária (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001); na diferenciação e ativação de células B e T (DUNKELBERGER; SONG, 2010) e da modulação de processos inflamatórios. Este último porque o sistema complemento participa da produção de mediadores inflamatórios e citocinas (DE JONG; VAN DER POLL; WIERSINGA, 2010), da fagocitose, da quimiotaxia de leucócitos, da liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos, vasoconstrição, opsonização, aumento da permeabilidade vascular e liberação de espécies reativas de oxigênio (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Mesmo com sua função extremamente importante na defesa do organismo, os patógenos possuem mecanismo de fuga do ataque imunológico, chamado de mecanismo de subversão do sistema imunológico. Um deles é feito pelo herpesvírus e o vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency vírus*, HIV) tipo I, os quais incorporam proteínas regulatórias do complemento a seus envelopes e pela expressão de moléculas que mimetizam a função das proteínas reguladoras. O HIV possui ainda uma protease que cliva o componente C3 (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001), impedindo que a cascata do complemento aconteça.

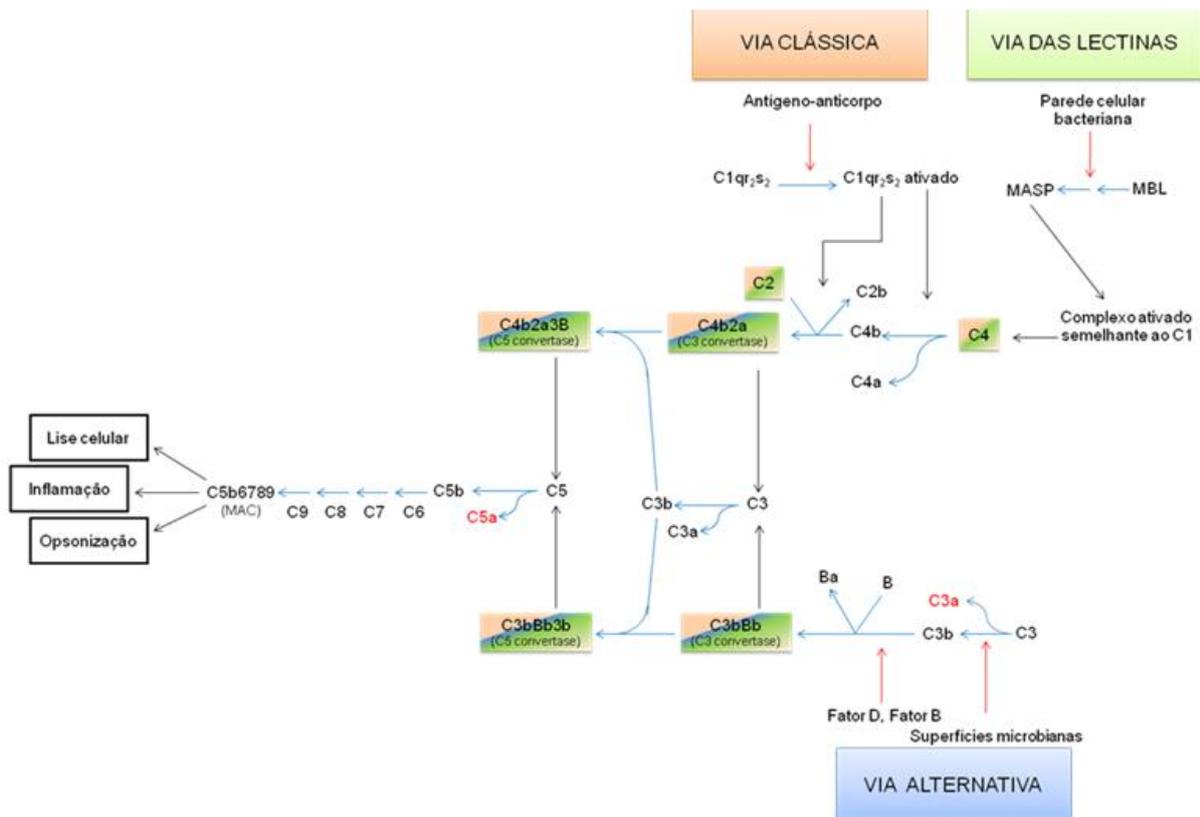


FIGURA 2: Visão geral das vias de ativação do sistema complemento. FONTE: Adaptado de LENZI, 2011; GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; DUNKELBERGER; SONG, 2010.

NOTA: A via clássica inicia-se por meio da ligação do C1 aos complexos antígeno-anticorpo. A via alternativa inicia-se por meio da ligação do C3b às superfícies de ativação, tais como paredes celulares bacterianas. A via das lectinas inicia-se por meio da ligação da proteína sérica MBL à superfície do patógeno. As três vias geram os mediadores inflamatórios C3a e C5a (em vermelho), as C3 e C5 convertases (em laranja, azul e verde) e o C5 ligado, que é convertido em um complexo de ataque à membrana (MAC) juntamente com outros componentes. A hidrólise de C3 é o principal passo na amplificação de todas as vias, gerando grandes quantidades de C3b, que forma parte da C5 convertase e que se liga aos complexos imunológicos ou às superfícies celulares estranhas, onde ele atua como uma opsonina. As setas pretas indicam a atividade enzimática; as setas azuis as etapas da reação e as vermelhas a ativação.

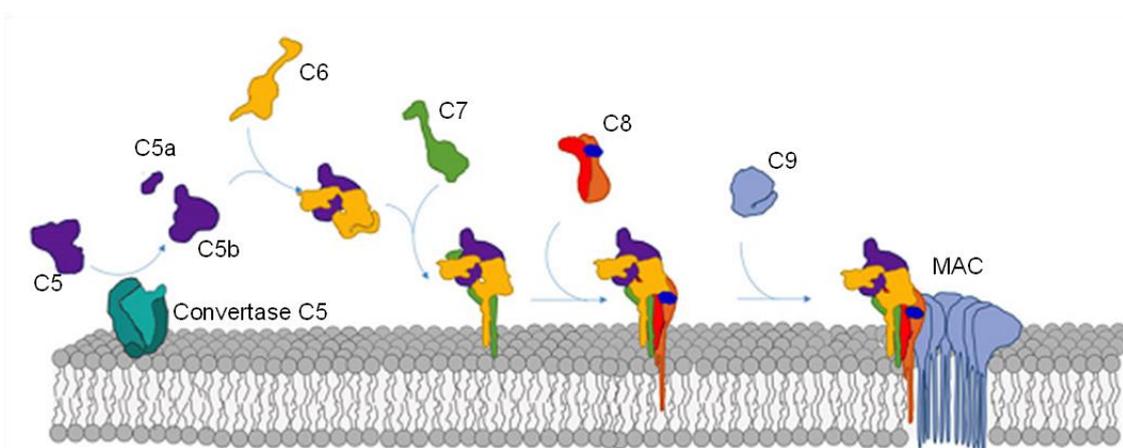


FIGURA 3: Esquema passo-a-passo da formação do MAC. FONTE: Adaptado de BAYLY-JONES; BUBECK; DUNSTONE, 2017.

1.1.3.1 Via clássica do sistema complemento

A via clássica é ativada quando o componente C1q interage com anticorpos na superfície de células apoptóticas ou microbianas, que podem ser IgM e IgG, os quais podem ser provenientes de uma resposta humoral ou podem ser já existentes (JANEWAY *et al.*, 2003). Além dos anticorpos, proteína C reativa (PCR), pentaxina 3, proteína amilóide sérica P e outros ligantes podem ativar o complemento. Essa interação provoca a ativação das proteases C1r e C1s, as quais clivam C4 e C2 para formar C4Bc2a (C3 convertase) (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009). É importante ressaltar que as moléculas C3b formadas durante a cascata da via clássica servem como substrato para a ativação da via alternativa, sendo este mecanismo chamado de alça de amplificação (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

1.1.3.2 Via alternativa do sistema complemento

A via alternativa é ativada pela hidrólise espontânea de C3 em pouca quantidade de forma constante, ou seja, é uma via autoativa e não necessita de anticorpos para ser ativada. Além disso, essa via contribui com cerca de 80% da ativação total induzida pelas três vias (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009), pois na presença de um ativador exógeno ela é amplificada (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Essa via pode ser ativada pela presença de certos fungos, bactérias e alguns tipos de helmintos e vírus que não possuem ácido siálico na membrana (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001). Certos lipídios, proteínas e carboidratos possuem a propriedade de ativar a via alternativa do complemento (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009) como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias, além de alguns imunocomplexos e o fator de veneno de cobra (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

1.1.3.3 Via das lectinas do sistema complemento

A via das lectinas é ativada com a interação entre a lectina sérica ligadora de manose (*mannose binding lectin*, MBL) associada a proteases séricas (MASPs) e carboidratos que contêm manose na superfície de bactérias (JANEWAY *et al.*, 2003) e de certos vírus (THIEL *et al.*, 1997). As MASPs que clivam C4 e C2 na via das lectinas são

estruturalmente análogas a C1r e C1s na via clássica. Assim como a via alternativa, esta via independe de anticorpos. (GAL *et al.*, 2007).

1.1.3.4 Moléculas reguladoras do sistema complemento endógenas

Pelo fato do sistema complemento ser inespecífico, ele ataca agentes invasores e pode atacar células do próprio hospedeiro (BAYLY-JONES; BUBECK; DUNSTONE, 2017). O controle da atividade do sistema complemento para evitar que as células autólogas sofram dano é feito com proteínas regulatórias, sejam elas de membrana ou proteínas solúveis. Existem muitas moléculas endógenas que fazem esse controle (BOTTO *et al.*, 2009; ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001), no entanto as principais estão listadas na TABELA 1.

TABELA 1: MOLÉCULAS ENDÓGENAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO.

MOLÉCULA REGULADORA	MASSA MOLECULAR (kDa)	FUNÇÕES
Inibidor de C1 (C1-Inh) *	110	Liga-se a C1 inativo e evita a sua ativação espontânea inibindo a ativação da via clássica; inibe MASP-1 e MASP-2 impedindo a ativação da via das lectinas.
Proteína de ligação de C4b (C5bp) *	500	Interage com C4b inibindo competitivamente sua ligação com C2a; acelera a dissociação de convertase C3 da via clássica.
Fator H (FH) *	150	Inibe competitivamente a interação do fator B a C3b; acelera a dissociação de convertase C3 da via alternativa (C3bBb) por dissociação de Bb.
Fator I *	88	Cliva C4b e C3b.
Proteína S (vitronectina) *	83	Liga-se ao complexo C5b-7 no sítio de ligação à membrana.
Properdina *	220	Estabiliza as convertases.
Receptor de complemento 1 (CR1; CD35) **	190-280	Acelera a dissociação das convertases C3 e C5 da via clássica e da alternativa.
Cofator de proteína de membrana (MCP; CD46) **	45-70	Atua como cofator do Fator I na clivagem de C3b e C4b.
Fator de aceleração de decaimento (DAF; CD55) **	70	Acelera a dissociação da C3 convertase.
Inibidor de membrana de lise reativa (protectina; CD59) **	18	Bloqueia a ligação de C7 e C8 ao MAC.

FONTE: Adaptado de ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001; BOTTO *et al.*, 2009.

LEGENDA: As moléculas marcadas com um asterisco azul (*) são reguladores solúveis; as moléculas marcadas com dois asteriscos vermelhos (**) são os reguladores de membrana.

Quando há a perda no equilíbrio entre ativação e inibição da cascata do complemento e há comprometimento do funcionamento eficaz dessas moléculas aparecem doenças, como por exemplo, a doença autoimune angioedema, causada pela deficiência do inibidor de C1. A deficiência de C1-Inh também está associada com comprometimento do sistema nervoso central (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001). Além disso, deficiências no complemento são associadas com doenças autoimunes, doenças que formam complexos imunológicos e com o aumento de risco de infecções especialmente de espécies como *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria sp.*, redução da opsonização e da fagocitose (YU *et al.*, 2005).

Considerando que o sistema complemento é um importante mediador do processo de inflamação e que a ativação excessiva do SC pode estar envolvida na patogênese de muitas patologias e situações clínicas, a investigação da atividade biológica de moléculas que possam modular o sistema complemento, mais especificamente, inibir a cascata de ativação deste sistema, torna-se de grande relevância terapêutica para diversas doenças.

1.1.4 Moléculas reguladoras do sistema complemento exógenas

Além das moléculas endógenas que regulam a ação do sistema complemento, existem moléculas exógenas que podem atuar modulando esse sistema, chamadas de imunomoduladores. Os imunomoduladores são moléculas que modificam as respostas biológicas do organismo por meio da modulação do sistema imunológico (SANTA, 2006). Diversas moléculas têm atividade imunomoduladora como os polissacarídeos, que podem ser provenientes de diversas fontes como plantas, fungos e algas (FERREIRA *et al.*, 2015). Polissacarídeos podem interagir de forma direta ou indireta com as células do sistema imunológico assim como com as moléculas envolvidas na imunidade humoral, como a cascata do complemento. Por exemplo, a atuação sobre a capacidade fagocítica de macrófagos e também sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS); atuação no aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como certas interleucinas (IL-6, IL-8, IL-12), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon (INF- γ); atuação na modulação do sistema complemento; proliferação de leucócitos; proliferação e diferenciação de macrófagos (FERREIRA *et al.*, 2015). Todas essas formas de atuação ressaltam o potencial terapêutico destes polissacarídeos já que tornam a resposta do hospedeiro mais eficiente contra patógenos (SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

Polissacarídeos ativam o sistema imunológico por meio de receptores específicos que determinarão a resposta. São eles chamados de receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors*, PRRs), expressos no interior ou na superfície de diversos tipos celulares do sistema imunológico, e que reconhecem estruturas conservadas (padrões moleculares associados a patógeno). Além dos PRRs há também os receptores *scavengers* (RS) e os receptores *toll-like*.

No plasma sanguíneo, os receptores padrões solúveis incluem ficolinas, lectina ligadora de manana (*mannan-binding lectin*, MBL), proteína ligadora de lipopolissacarídeos (*lipopolysaccharide-binding protein*, LBP), proteína C reativa (PCR) e

proteínas das vias clássica e alternativa do complemento (FERREIRA *et al.*, 2015). A interação dos polissacarídeos imunoestimuladores com os receptores promove a cascata de sinalização celular levando a indução de transcrição de genes (XU *et al.*, 2014).

As características dos polissacarídeos envolvidas na atividade sobre o sistema imunológico incluem o tipo de polissacarídeo, massa molecular, presença de grupos funcionais como grupos acetil e grupos sulfato, conformação e as ramificações. Esses fatores estruturais e sua combinação podem causar diferenças na atividade imunomoduladora de diversas maneiras. Por exemplo, a presença dos grupos funcionais acetil e/ou sulfato podem afetar a carga, a solubilidade e a conformação; os grupos acetil formam bolsões hidrofóbicos nos polissacarídeos e os grupos sulfato fazem com que a molécula adquira cargas negativas (FERREIRA *et al.*, 2015).

Diversos polissacarídeos foram reportados com atividade imunomodulatória, como por exemplo: glucanas, mananas, (arabino)galactanas, arabinanas, xilanas, fructanas, fucoidanas e polissacarídeos pécticos (FERREIRA *et al.*, 2015). Dentre estes os que atuam modulando o sistema complemento estão as arabinanas (PAULSEN, 2001), a β -D-glucana, as mananas, as pectinas, as porfiranas, as arabinogalactanas (FERREIRA *et al.*, 2015), as arabinogalactanas-proteínas (AGPs) (ALBAN *et al.*, 2002) e os polissacarídeos sulfatados (YU *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2015) (TABELA 2).

Muitos polissacarídeos apresentam características de imunoestimulantes, uma vez que atuam na ativação dos diferentes elementos e mecanismos do sistema imunológico. Os imunoestimulantes podem reforçar a resistência natural do organismo, para o combate a infecções ou para ajudar no tratamento do câncer e de outras patologias relacionadas com o sistema imunológico debilitado (MELIS *et al.*, 2015). Assim, a modulação do sistema complemento, tanto para inibição como ativação, representa uma estratégia relevante com potencial aplicação para uma variedade de diferentes patologias.

TABELA 2: CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE IMUNOMODULADORES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO.

POLISSACARÍDEO	ESTRUTURA QUÍMICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E SISTEMA COMPLEMENTO
Glucanas	Conformação de tripla-hélice	Estimula a produção de TNF- α por macrófagos e monócitos; ativação do complemento; aumento da produção de NO.
Mananas	Peso molecular (10k Da); presença de grupos acetil e sulfato	Aumento da ativação de linfócitos B; ativação de complemento; aumento da produção de NO, TNF- α ; aumento da fagocitose.
Xilanas	?	Efeito estimulatório sobre o sistema imunológico.
Fructanas	Conformação helicoidal	Aumento da proliferação de linfócitos.
Fucoidanas	Grupos sulfato e grupos acetil	Indução de TNF- α e algumas interleucinas; estimulação de atividade de macrófagos; efeito imunomodulador de sistema complemento.
Polissacarídeos pécticos	Alta massa molecular (> 50 kDa); presença de grupos acetil; AG-I	Ativação do sistema complemento; atividade estimulatória de macrófagos.
Polissacarídeos sulfatados	Grupos sulfato; grupos acetil	Efeito inibitório do sistema complemento; efeito estimulatório na produção de NO por macrófagos.

FONTE: Adaptado de ALBAN *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2015.

1.1.4.1 Pectinas

As pectinas (FIGURA 4) são polissacarídeos ácidos presentes na parede celular de vegetais. Possuem função na sinalização celular e na estrutura da planta, auxiliando no crescimento e no desenvolvimento. São compostas por cerca de 150 a 500 unidades de ácido galacturônico (GalpA) parcialmente esterificado com grupos metoxilícos, unidos por ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4) (COELHO, 2008; SEYFRIED *et al.*, 2015). Em solução aquosa apresentam a capacidade de produzir géis ou soluções altamente viscosas.

As pectinas são classificadas em três grupos principais, de acordo com sua estrutura: (1) homogalacturonanas (HG), (2) ramnogalacturonanas tipo I (RG-I) e (3) ramnogalacturonanas tipo II (RG-II). Polissacarídeos constituídos por arabinose e/ou galactose, tais como arabinanas, galactanas e arabinogalactanas, podem ser encontrados associados com pectinas (SEYFRIED *et al.*, 2015). A correlação entre estrutura química das pectinas e polissacarídeos contendo arabinose e galactose com a modulação da atividade do complemento é atribuída com a presença de cadeias laterais neutras compostas por β -D-Galp O-3 e O-6 ligadas (KIYOHARA; CYONG; YAMADA., 1988; KIYOHARA; YAMADA, 1989). Além disso, as RG-I ligadas à cadeias laterais de arabinogalactanas I (AG-I) e arabinogalactanas II (AG-II), que possuem alta massa molecular (> 50 kDa) contribuem de forma mais significativa para a modulação do sistema complemento (YAMADA *et al.*; 1985a; AUSTARHEIM *et al.*, 2014).

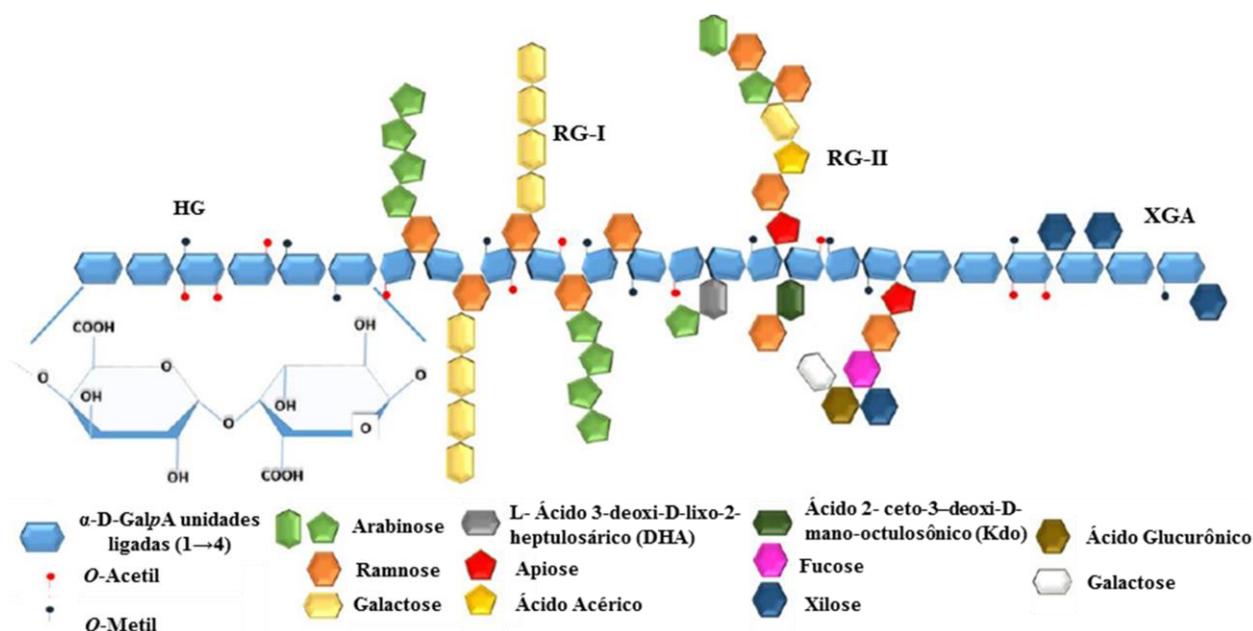


FIGURA 4: Representação esquemática da estrutura das pectinas com cadeia principal formada por HG intercalada com RG-I ramificada e RG-II. FONTE: ALBUQUERQUE *et al.*, 2016.

NOTA: HG: homogalacturonana; RG-I: ramnogalacturonana tipo I; RG-II: ramnogalacturonana tipo II; XGA: xilogalacturonana.

1.1.4.2 Arabinogalactanas (AGs) e arabinogalactanas-proteínas (AGPs)

Arabinogalactanas são polissacarídeos solúveis em água (MIKHAILENKO *et al.*, 2016) e podem ocorrer de duas formas, as quais são descritas como arabinogalactanas do tipo I (AG-I) e arabinogalactanas do tipo II (AG-II) (FIGURA 5). AG-I possui uma cadeia principal linear composta por unidades glicosídicas de β -D-Galp (1→4) ligadas, com

ramificações na posição 3 de unidades glicosídicas de α -L-Araf (FIGURA 5a). AG-I também podem ser encontradas associadas com pectinas. AG-II possui cadeias principais formadas por β -D-Galp que podem ser (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) ligadas (FIGURA 5b). Outros monossacarídeos podem aparecer como a L-Rhap, D-Manp, D-GlcAp e D-GalAp. Além disso, AG-II pode ser encontrada associada com proteínas (BENTO; NOLETO; PETKOWIC, 2014), as quais se chamam arabinogalactanas-proteínas.

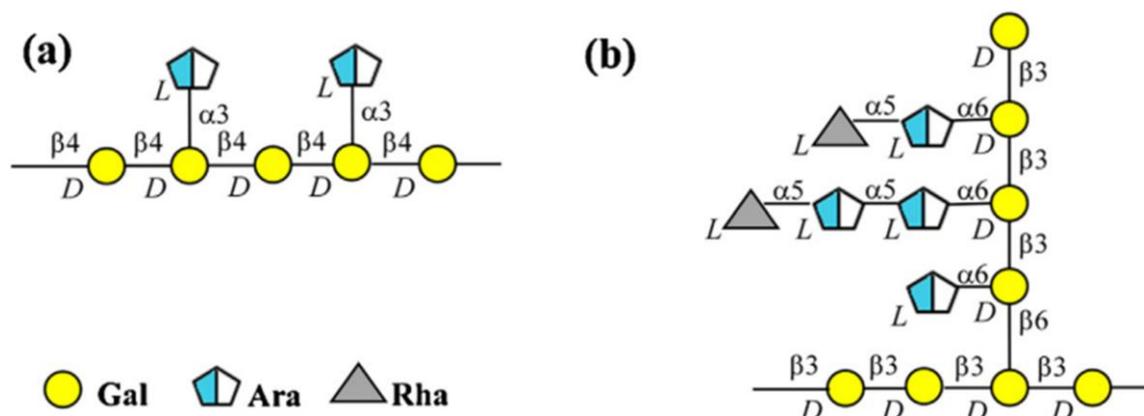


FIGURA 5: Representação esquemática da estrutura de uma arabinogalactana tipo I (a) e arabinogalactana tipo II (b). FONTE: Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2015.

As AGPs (FIGURA 6) são um grupo de glicoproteínas vegetais ricas em hidroxiprolina (HRGPs) e são encontrados na parede celular de plantas. Elas são produtos do metabolismo primário de vegetais inferiores e superiores. Quanto à sua estrutura, as AGPs consistem em um núcleo proteico que varia nos domínios complexos e no comprimento de uma ou mais cadeias laterais de AG. Pode apresentar também uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (RUMYANTSEVA, 2005). É importante ressaltar a grande afinidade das AGPs como o reagente sintético β -Glucosil Yariv (YARIV; RAPPORT; GRAF, 1962; YARIV; LIS; KATCHALSKI, 1967), e assim, este reagente se mostra uma ferramenta eficaz para identificação, purificação e quantificação das AGPs (YAMASSAKI, 2013). As características relevantes para a sua ação no sistema complemento são o tipo de núcleo da proteína, a composição de aminoácidos, a presença de cadeias laterais de arabinose e a reatividade ao reagente Yariv (ALBAN *et al.*, 2002).

Quanto ao mecanismo de ação para a modulação do sistema complemento das pectinas, das AGs e das AGPs acredita-se que elas interajam com o componente C1q (YAMADA *et al.*; 1985a), induzindo dessa forma a ativação da via clássica e da via alternativa. Além de C1 acredita-se que também ocorra interação com outros componentes como o C2, a C3 convertase e C4 (MICHAELSEN *et al.*, 2000).

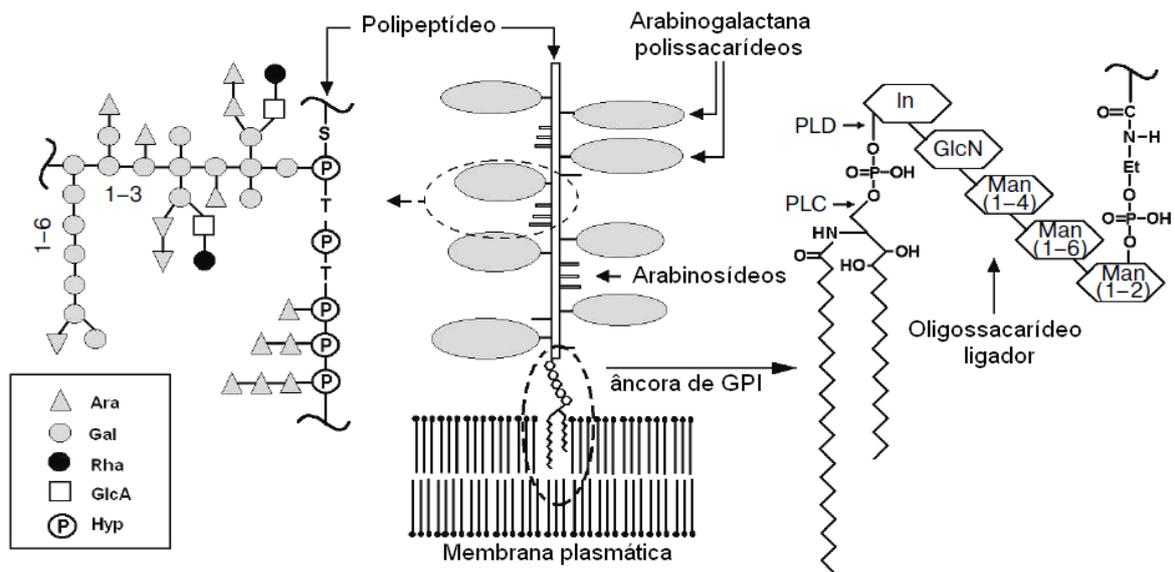


FIGURA 6: Representação da estrutura de uma AGP. FONTE: LENZI, 2011; RUMYANTSEVA, 2005.

1.1.4.3 Glucanas e mananas

A estrutura química das β -glucanas consiste em um esqueleto composto por glucose, que podem ser α -D-glucana, β -D-glucana ou uma mistura α,β -D-glucana (FERREIRA *et al.*, 2015) (FIGURA 7 e 8). As ligações entre elas podem ser ($\beta 1 \rightarrow 3$), ($\beta 1 \rightarrow 4$) e ($\beta 1 \rightarrow 6$) ou ($\alpha 1 \rightarrow 3$), ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e ($\alpha 1 \rightarrow 6$) e ramificações podem estar localizada na posição 6 (1-6) ou 4 (1-4) da cadeia principal. As ligações e ramificações das β -glucanas afetam a solubilidade e a atividade biológica. E já se sabe que algumas β -glucanas lineares são consideradas imunomoduladoras (NOTARARIGO *et al.*, 2014). Porém, as glucanas podem também apresentar diversas combinações de monossacarídeos (heteroglucanas) que, combinadas a fatores como conformação, grau de ramificação, peso molecular e presença de grupos funcionais, fornecem a esse grupo a propriedade de interagir de diferentes formas com o sistema imunológico (FERREIRA *et al.*, 2015).

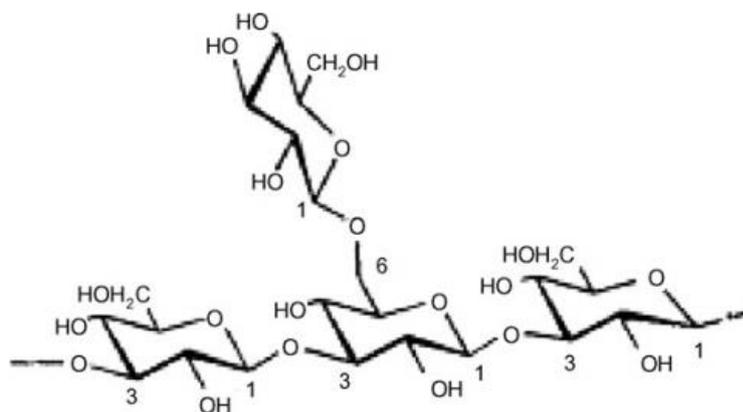


FIGURA 7: Estrutura de $(\beta 1 \rightarrow 3)$ -D-glucana com ramificações $(\beta 1 \rightarrow 6)$. FONTE: MANTOVANI *et al.*, 2008.

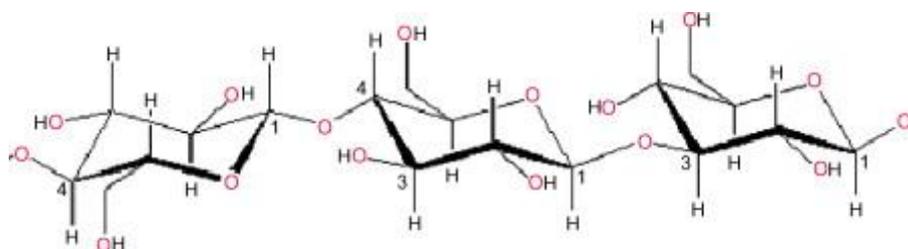


FIGURA 8: Estrutura de $(\beta 1 \rightarrow 3)$ -D-glucana com ramificações $(\beta 1 \rightarrow 4)$. FONTE: MANTOVANI *et al.*, 2008.

O esqueleto de mananas com propriedades imunoestimulatórias (FIGURA 9) consiste principalmente $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -D-Manp, $(\beta 1 \rightarrow 3)$ -D-Manp ou $(\alpha 1 \rightarrow 3)$ -D-Manp, $(\beta 1 \rightarrow 2)$ -D-Manp e $(\beta 1 \rightarrow 6)$ -D-Manp ou $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ -D-Manp. Diferenças estruturais provêm do grau de ramificação e da sequência da cadeia principal, além da presença ou não de unidades glicosídicas β -D-Galp, D-Manp ou D-Glcp ou de grupos funcionais, como grupamentos acetil, nos lados da cadeia principal (FERREIRA *et al.*, 2015).

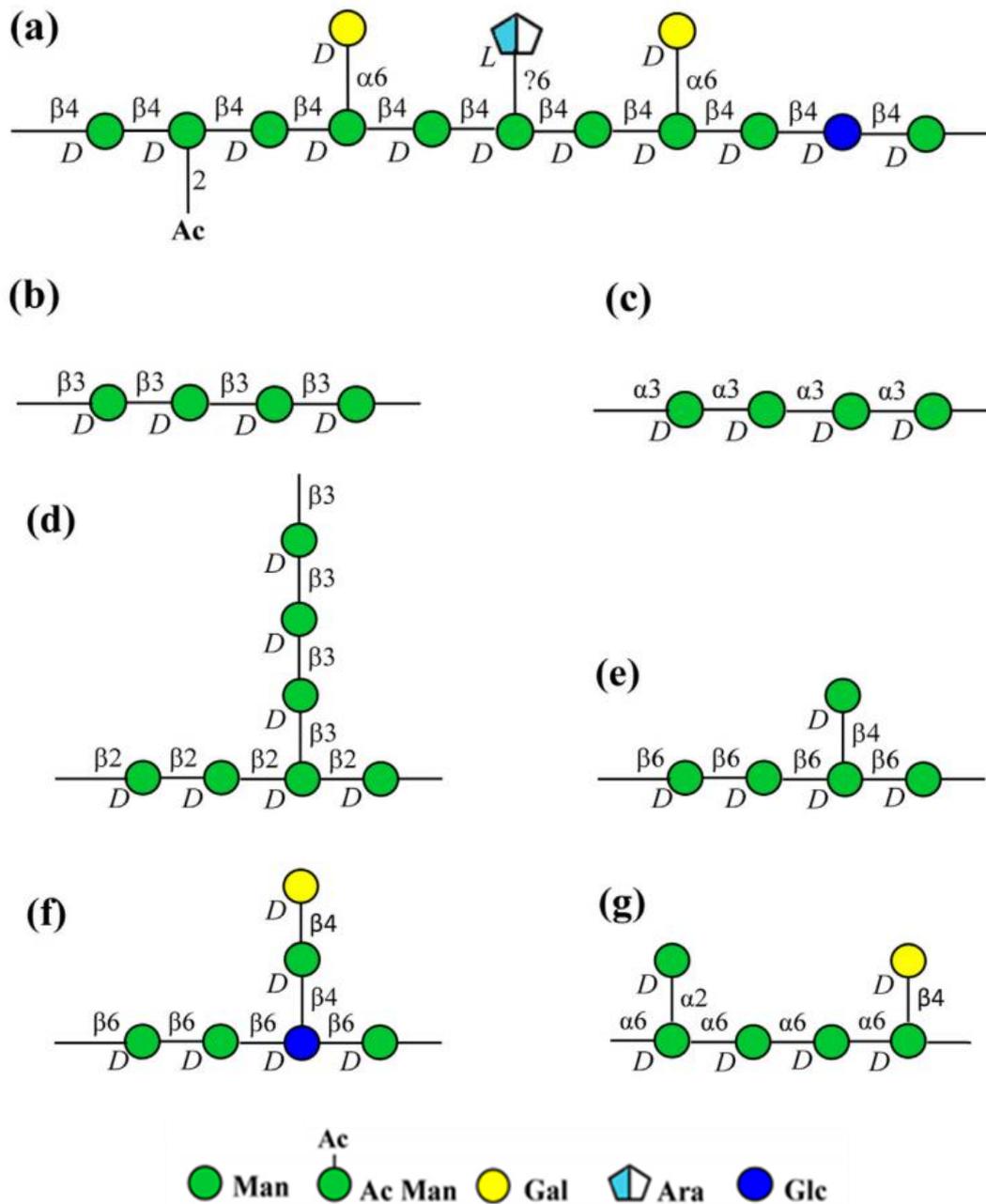


FIGURA 9: Representação esquemática de possíveis estruturas químicas de mananas imunoestimulatórias: (a) $(\beta 1\rightarrow 4)$ -D-manana; (b) $(\beta 1\rightarrow 3)$ -D-manana; (c) $(\alpha 1\rightarrow 3)$ -D-manana; (d) $(\beta 1\rightarrow 3)$ -ramificada, β -(1 \rightarrow 2)-D-manana; (e) e (f) $(\beta 1\rightarrow 6)$ -D-manana; e (g) $(\alpha 1\rightarrow 6)$ -D-manana. FONTE: Adaptado de FERREIRA *et al.*, 2015.

1.1.4.4 Polissacarídeos sulfatados

Dentre os polissacarídeos sulfatados que exercem efeito sobre os componentes do sistema imunológico, incluindo o sistema complemento, estão as porfiranas (FIGURA 10) (ISAKA *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2015), a heparina e o heparan sulfato (ALBAN *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2005).

As porfiranas são galactanas sulfatadas lineares compostas por unidades de β -D-galactose, alternadas com 3,6-anidro- α -L-galactose ou α -L-galactose-6-sulfato (ISAKA *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2015). Elas são encontradas em algas marinhas. O alto nível de sulfatação é o que garante os efeitos sobre a resposta celular e humoral do sistema imunológico (FERREIRA *et al.*, 2015).

A heparina (FIGURA 11) é um polissacarídeo linear altamente sulfatado. A heparina endógena é um polissacarídeo intracelular, localizado nos grânulos de mastócitos. Já o heparan sulfato é um polissacarídeo extracelular estruturalmente relacionado à heparina, encontrado no plasma e no endotélio, e provavelmente é responsável pela maioria das atividades fisiológicas normais que também são atribuídas à heparina (YU *et al.*, 2005). A heparina interage com as proteínas do sistema complemento, contudo pouco se sabe sobre as afinidades e a cinética que estão relacionadas às suas interações. O que se pode afirmar é que a heparina inibe a ativação das vias clássica e alternativa (EDENS; LINHARDT; WEILER, 1993; ALBAN *et al.*, 2002).

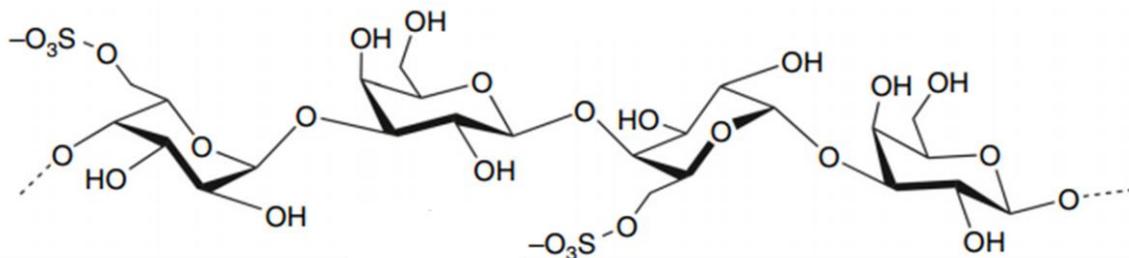


FIGURA 10: Estrutura das porfiranas. FONTE: Adaptado de HEHEMANN; BORASTON; CZJZEK, 2014.

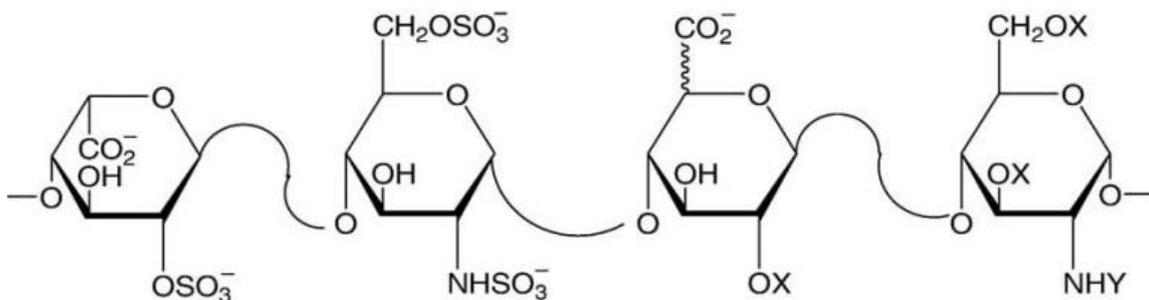


FIGURA 11: Representação da estrutura da heparina. FONTE: YU *et al.*, 2005.
NOTA: X=SO₃⁻ ou H e Y= SO₃⁻, COCH₃ ou H.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade *in vitro* das frações polissacarídicas nativa e modificada quimicamente por sulfatação e carboxirredução de *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. e o ácido pécico comercial sobre o sistema complemento humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) caracterizar as frações nativa (W-OP), a modificada por sulfatação (WS-OP) e o ácido pécico comercial (AP);
- b) obter e caracterizar a fração modificada por carboxirredução (WC-OP);
- c) avaliar a atividade biológica das quatro (4) frações (nativa, modificadas quimicamente e do ácido pécico comercial) utilizando o teste hemolítico da fixação do sistema complemento;
- d) relacionar as características estruturais das frações testadas com a atividade biológica obtida.

3. JUSTIFICATIVA

Diversas condições inflamatórias e autoimunes têm sido direta ou indiretamente relacionadas às disfunções no SC, seja por uma ativação inadequada da cascata ou por alterações na expressão e função de proteínas reguladoras. Desta forma, considerando que o SC é um importante mediador do processo de inflamação, a investigação da atividade biológica de moléculas que possam modular este sistema, mais especificamente, inibir a cascata de ativação, torna-se de grande relevância terapêutica para diversas patologias. Por outro lado, a ativação do SC pode atuar em termos de imunoestimulação não específica, em situações clínicas que necessitem de um reforço adicional para o sistema imunológico. Assim, dependendo do enfoque ou da situação clínica tanto a inibição como a ativação do SC podem ser relevantes.

Assim, considerando seu potencial, os polissacarídeos provenientes de diversas fontes como plantas, fungos e algas, como compostos imunomoduladores (FERREIRA *et*

al., 2015), podem ser uma alternativa extremamente viável, por serem de fonte natural e barata, na utilização como fármaco no tratamento de sintomas relacionados a doenças de origem inflamatória.

4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

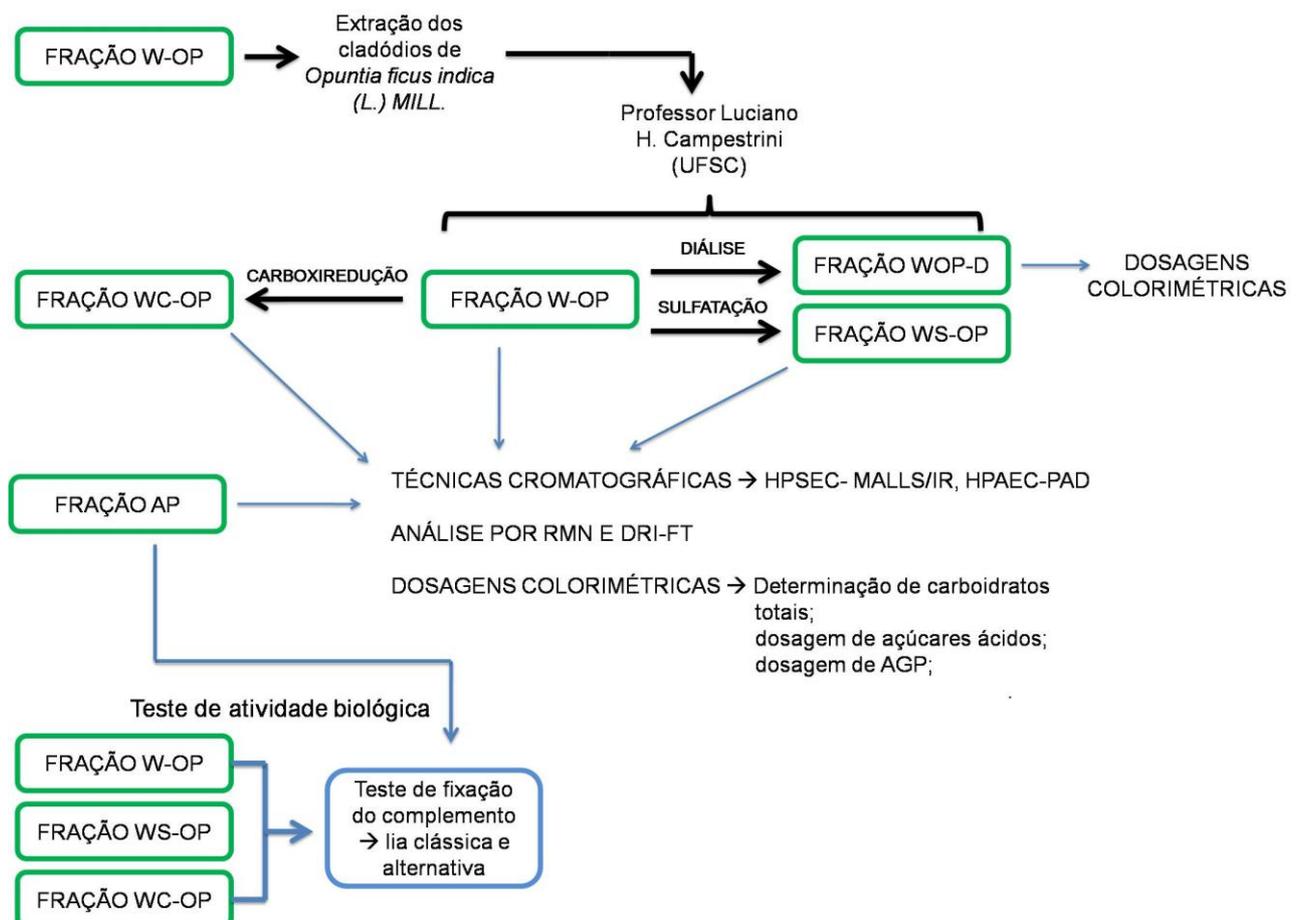


FIGURA 12: Fluxograma da estratégia experimental realizada no presente trabalho. FONTE: A autora (2018).

NOTA: Fração W-OP: fração nativa; fração WOP-D: fração nativa dialisada; fração WS-OP: fração sulfatada; fração WC-OP: fração carboxirreduzida; fração AP: ácido pectínico comercial.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 EXTRAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES NATIVA (W-OP) E NATIVA DIALISADA (WOP-D)

Foram caracterizadas e utilizadas para os ensaios biológicos as frações nativa (W-OP), nativa dialisada (WOP-D), sulfatada (WS-OP), obtidas e cedidas pelo professor

Dr. Luciano H. Campestrini (Dep. Bioquímica - UFSC), e carboxirreduzida (WC-OP) provenientes de *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. e o ácido péctico comercial (AP) proveniente do limão (*Citrus limon*) (fração péctica do tipo homogalacturonana).

As amostras de *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. (palma forrageira) utilizadas foram coletadas em setembro de 2015 na propriedade Capril Rancho Colorado, localizada em Macaíba, RN, na estrada Macaíba-Pajuçara, km 3, canavial 2, situado na mesorregião Leste Potiguar. Uma exsicata do material vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Paraná, UFPR sendo identificada pelo técnico Fernando B. Matos, com o número de UPCB 85365. Para a realização do experimento foram utilizados apenas os cladódios da planta (FIGURA 12).



FIGURA 13: Imagem dos cladódios da palma forrageira. Nota: Caules modificados (Cladódios). FONTE: Foto cedida pelo professor Dr. Luciano H. Campestrini (Dep. Bioquímica – UFSC).

A fração polissacarídica W-OP de *Opuntia ficus-indica* foi obtida de cladódios terciários (maduros com cerca de 25 x 15 cm). Após lavagem e retirada da casca a polpa foi separada e em seguida triturada em liquidificador e centrifugada por 30 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante (característica viscosa) obtido foi separado do material sólido e a ele foram adicionados 3 volumes de etanol comercial (96%). Após a separação da fração polissacarídica, esta foi coletada, liofilizada e moída. A fração bruta W-OP foi solubilizada (1 mg/mL) e dialisada em membrana de 12-14 kDa por 48 horas em sistema fechado, contra água destilada. O material foi coletado da membrana e liofilizado. W-OP foi sulfatada quimicamente pelo método descrito por ARAÚJO (2012).

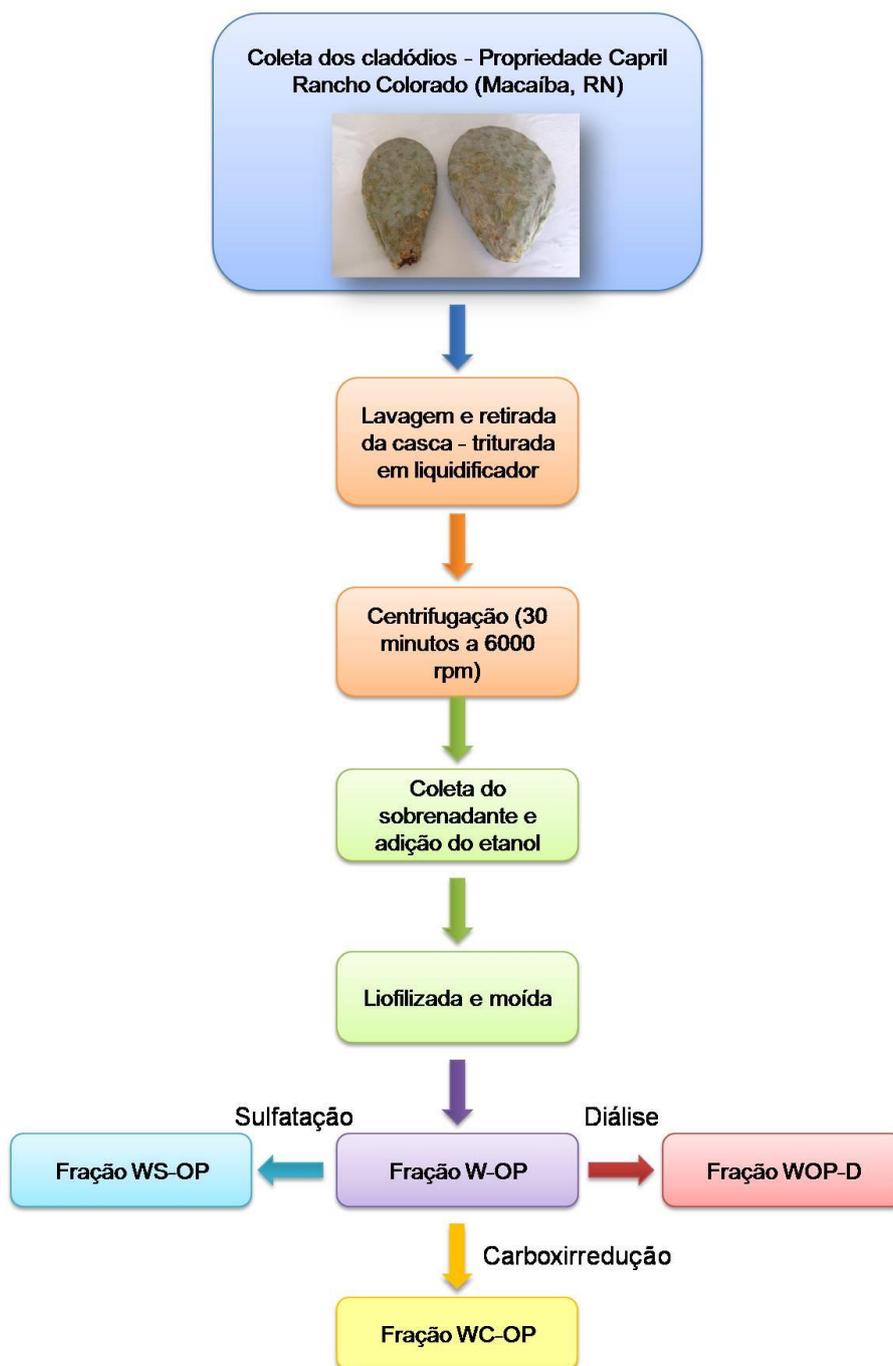


FIGURA 14: Esquema da extração e obtenção das frações. FONTE: A autora (2018).

5.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SULFATADA (WS-OP)

A sulfatação acontece através de reação de substituição nucleofílica em grupos hidroxila formando ésteres de sulfato. A fração W-OP foi sulfatada quimicamente, obtendo-se a fração sulfatada (WS-OP), de acordo com a metodologia descrita por ARAÚJO (2012). A fração W-OP (50 mg) foi dissolvida em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) anidro em banho-maria a 50 °C até dissolver. Em seguida adicionou-se, sob

agitação, 500 mg do complexo de trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$), e deixou-se reagindo por 8 horas. O pH foi corrigido para 7 com adição de 0,3 mL de trietilamina.

A reação foi interrompida com gelo picado dentro do meio reacional e ao atingir a temperatura ambiente o material foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi redissolvido em água e dialisado em membrana de 6-8 kDa por 24 horas gerando a fração WS-OP (ARAÚJO; 2012).

O conteúdo de grupos sulfatos foi determinado pelo método descrito por DOGSON & PRICE (1962) correspondendo a 44,75% (comunicação pessoal por prof^o Dr. Luciano Campestrini - UFSC).

5.3 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO MODIFICADA POR CARBOXIRREDUÇÃO (WC-OP)

A partir da fração nativa W-OP foi realizado o procedimento de carboxirredução para obtenção da fração carboxirreduzida (WC-OP), de acordo com o método descrito por TAYLOR e CONRAD (1972). Com este procedimento os ácidos carboxílicos foram reduzidos às suas unidades glicosídicas e desta forma a fração obtida possui menor teor ácido do que a fração nativa.

Uma parte da fração W-OP (200 mg) foi solubilizada em 15 mL de tampão MES (ácido 2-[*N*-morfolina]-etanossulfônico) 0,2 mol/L, pH 4,75. A seguir, foi adicionado, aos poucos e sob agitação, 3,280 g de 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida meta-*p*-toluenossulfonato (CMC). A mistura permaneceu por 2 horas e 30 minutos sob agitação e então foi adicionado tampão TRIS (ácido *N*-tris[hidroximetil]metil-2-aminioetanossulfônico) 2 mol/L, pH 7,0, até estabilização do pH da mistura em 7,0. Em seguida, foi acrescentado NaBD_4 aos poucos, também sob agitação, até concentração final de 2 mol/L (1,3 g). A mistura permaneceu sob agitação por 18 horas e em seguida a redução foi interrompida pela adição de 3 mL de ácido acético, em banho de gelo, até pH 5,0. O material foi submetido à diálise em membranas com limite de exclusão de 12 kDa durante 48 horas e então, congelado e liofilizado.

5.4 ANÁLISES QUÍMICAS

5.4.1 Dosagens colorimétricas

Os teores de carboidrato total e de ácidos urônicos das três (3) frações e do ácido péctico comercial foram determinados por meio de dosagens colorimétricas. Em todos os ensaios, 200 µL da solução final foram transferidos dos tubos tipo *ependorf* para placas de fundo chato com 96 poços (Techno Plastic products AG® - TPP, Trasadingen - Suíça) para posterior leitura em espectrofotômetro de multiplaca (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA), nos comprimentos de onda específico para cada metodologia.

5.4.1.1 Dosagem de carboidrato total

O conteúdo de carboidrato total foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (FOX; ROBYT, 1991), utilizando ácido galcturônico como padrão em seis (6) concentrações: 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL para montagem da curva padrão. Nesse ensaio, açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados com grupos redutores livres, reagem com ácido sulfúrico sofrendo desidratação com posterior complexação com o fenol, gerando uma coloração laranja. A mudança da cor da solução é proporcional à quantidade de carboidratos presentes na amostra (DUBOIS *et al.*, 1956).

As amostras foram solubilizadas em solução de tampão HEPES/NaCl feito a partir da solução estoque de HEPES/NaCl na concentração de 1 mg/mL. Alíquotas de 40 µL dessas soluções foram transferidas para tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, em triplicata para cada amostra, além do branco da amostra (onde adicionou-se 40 µL de água destilada ao invés de fenol). Em seguida, 40 µL de fenol a 5% (p/v) foram misturados às soluções com o auxílio de pipeta e posteriormente homogeneizados cuidadosamente. Por fim, 200 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado foram adicionados, misturando-o da mesma forma. Após aquecimento a 100°C em estufa por 10 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo, a absorbância foi lida a 490 nm.

5.4.1.2 Dosagem de ácidos urônicos

A determinação da quantidade de ácidos urônicos presente nas frações foi realizada através de uma adaptação do método do *m*-hidroxibifenil descrito por

FILISSETTI-COZZI; CARPITA (1991). As amostras (100 μL) (previamente solubilizadas em tampão HEPES/NaCl na concentração de 1 mg/mL) foram pipetados em tubos tipo *ependorf*, em triplicata para cada amostra, além do branco da amostra (onde adicionou-se 10 μL de água destilada ao invés de *m*-hidroxibifenil). Em seguida, foram adicionados 10 μL de sulfamato de potássio (4 M, pH 1,6) e os tubos agitados em aparelho tipo vórtex. Posteriormente, foi feita adição de 600 μL de tetraborato de sódio (75 mM em H_2SO_4) e os tubos agitados em aparelho tipo vórtex. Após aquecimento a 100°C em estufa por 15 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo, 10 μL de *m*-hidroxibifenil (0,15 % m/v em hidróxido de sódio aquoso a 0,5 % m/v) foram adicionados e os tubos novamente agitados em vórtex. Após 10 min de repouso, a absorbância foi lida a 525 nm. A concentração em porcentagem de ácidos urônicos foi determinada se baseando em uma curva padrão de D-ácido glucurônico de seis (6) concentrações: 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.2 Dosagem de arabinogalactana-proteínas (AGP) por difusão radial em gel de agarose na presença do reagente de Yariv (β -Glucosil)

A dosagem de AGPs foi realizada por meio do método de difusão radial (*Single Diffusion*) em gel de agarose contendo o reagente β -GlcY, descrito por VAN HOLST; CLARKE (1985). As frações e o ácido pécico foram solubilizadas em uma solução de NaCl a 1% e aplicadas em orifícios de uma placa de gel de agarose tipo C a 1% (Calbiochem, La Jolla-CA. EUA) contendo 0,02 mg/mL do reagente β -GlcY. A placa permaneceu em repouso por 18 h, em ambiente úmido e temperatura ambiente para a realização da difusão radial das AGPs. A síntese do reagente β -GlcY foi realizada de acordo com YARIV *et al.*, 1962. O diâmetro do halo formado é proporcional à quantidade de AGP presente na amostra. Com utilização de um paquímetro, os diâmetros interno e externo dos halos foram mensurados, e a quantidade de AGP nas amostras foi calculada em relação à curva padrão feita com goma arábica (Sigma Aldrich.CO St. Louis-MO, EUA) com as seis (6) concentrações: 0,3; 0,6; 1,2, 2,4 e 3,0 μg /por poço de AGP. As frações AP, W-OP, WOP-D, WC-OP e WS-OP foram testadas primeiramente na concentração de 5 mg/mL como uma triagem para detectar presença ou não de AGPs. Posteriormente foram testadas na concentração de 10 mg/mL para determinação do teor de AGPs.

5.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

5.5.1 Cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

A análise do tipo de ácido urônico presente na fração AP e na fração W-OP foi realizada por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD), utilizando a metodologia adaptada descrita por LINA *et al.* (2006).

As duas frações AP (5 mg) e W-OP (5 mg) foram submetidas à hidrólise ácida total, utilizando 3 mL de TFA (2 M), durante 8 h a 100 °C em estufa. Após as 8 h as amostras foram secas com ar comprimido para retirada do ácido. Foram realizadas três (3) lavagens com metanol também utilizando ar comprimido para secar. Após as lavagens com metanol, água ultra pura foi adicionada ao material seco. As amostras foram filtradas em membrana de acetato-nitrito de celulose com porosidade de 0,22 µm (Techno Plastic products, AG® TPP, Trasadingen - CH). A amostra hidrolisada, livre de ácido, foi analisada em cromatógrafo modelo ICS-5000 Dionex™ (Thermo Scientific, San Jose, CA - EUA), utilizando como fase móvel água ultra pura, solução de hidróxido de sódio (250 mM) e tampão de acetato de sódio (1 M). Os resultados obtidos foram processados em *software* Chromeleon 7.

5.5.2 Cromatografia de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALL/RI)

Para determinação da homogeneidade da fração AP, as análises foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) (Waters, Massachusetts – EUA) que contém colunas, conectadas em série, de gel permeação Ultrahydrogel 200, 500, 250 e 120 (Waters, Massachusetts –EUA) com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ g/mol, respectivamente. O cromatógrafo é acoplado em série ao detector de espalhamento de luz laser, comprimento de onda de 632 nm, multiângulos, 18 ângulos (MALLS) (modelo DSP-F, Wyatt Technology, Califórnia - EUA) e ao detector de índice de refração (RI) (modelo 2410, Waters,

Massachusetts - EUA). Para análise dos resultados, foi utilizado *software* ASTRA (versão 450, Wyatt Technology, Massachusetts - EUA).

Para a análise de determinação da homogeneidade molecular a amostra AP foi preparada na concentração de 1 mg/mL em solução de nitrito de sódio 0,1 M contendo azida sódica 200 ppm. Em seguida, a amostra foi filtrada em membranas acetato de celulose Millipore de porosidade 0,22 μm (Millipore, Massachusetts - EUA) para remoção da porção insolúvel. A amostra foi injetada em fluxo de 0,6 mL/min a 20 °C.

Para o cálculo da massa molecular relativa foi utilizada uma curva de calibração feita com dextrans comerciais, a qual foi cedida pelo professor Dr. Diogo R. Bazan Ducatti (Dep. Bioquímica - UFPR).

5.6 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

5.6.1 Espectroscopia de infravermelho (DRI-FT)

As análises espectroscópicas no infravermelho (IR) foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Para a realização do experimento, aproximadamente 200 mg das frações AP, W-OP, WC-OP e aproximadamente 4 mg da WS-OP, liofilizadas, foram dispostas no aparelho (operando no modo DRIFT) da marca BRUKER, modelo Vertex 70 (Bruker; Karlsruhe – Alemanha), com detector DLatgs e fonte de KBr Broadband. Os espectros foram coletados no modo de reflectância difusa (DRI-FT) na frequência de 4.000 a 400 cm^{-1} , em resolução de 4 cm^{-1} e acumulação de 128 varreduras (velocidade: 10 kHz). Os dados foram processados em *software* Origin.

5.6.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ^{13}C) e de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) – HSQC

As frações AP, W-OP e WC-OP foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética de carbono 13 (^{13}C) e de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) – HSQC para caracterização estrutural. Os espectros foram obtidos em equipamento BRUKER 400 MHz, modelo DRX Avance (Bruker; Karlsruhe – Alemanha) em temperatura de 70 °C. As frações (10 mg para WS-OP; 30 mg para WC-OP e 50 mg para AP e W-OP) foram solubilizadas em água deuterada (D_2O) e liofilizadas por duas vezes. Os deslocamentos

químicos foram expressos em PPM (δ), baseados no padrão interno acetona (δ 29,92 no ^{13}C). Os espectros foram analisados no programa TOPSPIN.

5.7 EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS – *IN VITRO*

5.7.1 Teste de fixação do sistema complemento

Para o teste de fixação do complemento foram utilizados eritrócitos de carneiro (para via clássica) e eritrócitos de coelho (para via alternativa) (YAMADA *et al.*, 1985a; ALBAN *et al.*, 2002). O método se baseia na hemólise de eritrócitos causada pelo sistema complemento. Quando os eritrócitos são rompidos, liberam a hemoglobina em solução, gerando a coloração vermelha característica que permite a visualização da hemólise induzida pelo complemento. Para avaliar a interação de um determinado composto com o complemento, é necessária a incubação prévia entre a fração-teste e o sistema complemento (soro humano), antes da adição dos eritrócitos. Se o composto interage com o complemento, seja inibindo ou ativando-o, haverá uma diminuição na quantidade de complemento disponível para posteriormente ser ativado pelos eritrócitos que serão adicionados. Uma molécula ativadora apresenta hemólise aparente somente no ensaio sem pré-incubação, acompanhado de ICH_{50} diferentes entre os ensaios com e sem pré-incubação. Já uma molécula inibidora apresenta hemólise aparente no ensaio com e sem pré-incubação, acompanhado de ICH_{50} iguais entre os dois ensaios. Os resultados foram expressos em relação à percentagem de inibição de hemólise (ICH_{50}), comparando com diferentes controles ou tratamentos (ausência e presença de soluções-teste em diferentes concentrações) como descrito por YAMADA e colaboradores (1985a). O valor de ICH_{50} define a concentração de amostra que provoca 50% de inibição da lise de eritrócitos de carneiro ou coelho.

Os protocolos experimentais utilizando animais e soro humano foram aprovados pelos respectivos comitês de ética Comitê de Ética Animal (CEUA/BL) 1128 e Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) CEP 1739,156/2008-08 (Anexo 1 e 2).

5.7.2 Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro e coelho

Para a avaliação da hemólise foram utilizadas suspensões de eritrócitos de carneiro (via clássica) e de coelho (via alternativa). Para o preparo da suspensão de eritrócitos de carneiro, 5 mL de sangue de carneiro foram colhidos por punção venosa, e adicionados a tubos plásticos contendo solução anticoagulante EDTA.Na₂. Para o preparo da suspensão de eritrócitos de coelho, 5 mL de sangue de coelho foram colhidos por punção auricular e adicionados em tubos contendo o anticoagulante EDTA.Na₂. Tanto o sangue de coelho quanto o de carneiro foram centrifugados por 5 min a 1440 x g em centrífuga para tubos falcon.

Os eritrócitos de carneiro foram lavados três vezes com solução de NaCl a 0,9 % (m/v), e uma vez com tampão HEPES (10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,11 mM, MgCl₂ 0,5 mM, pH 7,4). Este tampão foi nomeado como tampão HC (HEPES - Clássica). Após a última centrifugação foi obtida a papa de eritrócitos (~2,5 mL), utilizada para o preparo da solução de eritrócitos a 2,4% (v/v) em tampão HC. Para a sensibilização dos eritrócitos de carneiro, foi adicionado o mesmo volume de hemolisina (soro de coelho anti-hemácia de carneiro) na concentração 1:1500, com posterior incubação por 30 min a 37° C. Após a sensibilização, a suspensão de eritrócitos de carneiro, na concentração final de 1,2% (v/v), foi utilizada na avaliação da via clássica.

Os eritrócitos de coelho foram lavados três vezes com solução de NaCl a 0,9 % (m/v), e uma vez com tampão HEPES/EGTA com Mg⁺² (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 7 mM, EGTA 10 mM, pH 7,4). Este tampão foi denominado tampão HA (HEPES - Alternativa). Após a última centrifugação, foi obtida a papa de eritrócitos (~2,5 mL), utilizada para o preparo da solução de eritrócitos a 2,4% (v/v) no tampão HA, para o ensaio da avaliação da via alternativa.

5.7.3 Obtenção de soro humano

Uma mistura de sangue humano foi utilizada como fonte dos componentes do sistema complemento. O sangue humano foi obtido de doadores voluntários e coletado na ausência de anticoagulante. Após a coagulação à temperatura ambiente, e centrifugação (20 min, a 1440 x g, 15° C), foi obtido o soro. A mistura de soro humano (MHS) foi estocada a 80 °C até sua utilização. A partir da MHS, foi realizada uma curva de titulação para determinação da quantidade de soro a ser utilizada nos ensaios. Para isso, a MHS

foi diluída (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800) e testada para determinação da quantidade de MHS necessária para provocar 50% de lise dos eritrócitos (carneiro ou coelho). Alíquotas de 100 μL de MHS (triplicata por diluição) foram adicionadas em placas de 96 poços (fundo V), juntamente com 100 μL da suspensão de eritrócitos de carneiro (1,2 % v/v) sensibilizada com hemolisina (via clássica) ou eritrócitos de coelho (2,4 % v/v) (via alternativa), e 100 μL do tampão (HC ou HA) correspondente a cada via. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e centrifugadas por 5 min a 1440 x g. O sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato e a leitura foi realizada a 405 nm em leitora de microplacas.

5.7.4 Preparo das soluções-teste utilizadas nos testes de fixação do complemento

As frações nativas e seus derivados modificados quimicamente, bem como a heparina bovina (utilizada como controle positivo de inibição do sistema complemento) e ácido péptico comercial (utilizado como controle de fração péptica) foram solubilizadas em tampão HEPES (10 mM, NaCl 150 mM) *overnight* sob agitação magnética na concentração de 5 mg/mL. A partir dessas soluções, foram realizadas as diluições em série (fator 2) das amostras W-OP, WC-OP e AP, originando as concentrações testadas nos experimentos: 1,6; 3,2; 6,5; 13; 26; 52; 104; 208; 416 e 833 $\mu\text{g/mL}$, as quais correspondem às concentrações finais das soluções-teste no experimento. Para a amostras WS-OP foi feita uma diluição em série com as concentrações 0,05; 0,10; 0,20; 0,40, 0,82; 1,6; 3,2; 6,5; 13; 26 $\mu\text{g/mL}$.

5.7.5 Avaliação da capacidade hemolítica das frações

As amostras foram previamente testadas em um ensaio de hemólise similar aos ensaios das vias clássica e alternativa, porém, sem a adição de soro, para avaliar a capacidade hemolítica da amostra. Alíquotas de 40 μL das soluções-teste foram adicionadas em placas de 96 poços (fundo V), juntamente com 100 μL da suspensão de eritrócitos de carneiro (1,2 % v/v) sensibilizada com hemolisina (via clássica) ou eritrócitos de coelho (2,4 % v/v) (via alternativa), e 100 μL do tampão (HC ou HA) correspondente a cada via. A placa foi incubada por 30 minutos a 37 °C e centrifugadas por 5 minutos a 1440 x g. O sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato para leitura a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas.

5.7.6 Avaliação da via clássica

Em placas de 96 poços (fundo V) foram adicionadas 40 µL de cada solução-teste em triplicatas para cada concentração obtida na diluição em série e 100 µL de soro humano diluído em HC [diluição determinada pela titulação, (1:75) correspondente a 50% de lise]. Uma das placas passou por 30 minutos de incubação prévia a 37 °C enquanto a outra não passou por incubação prévia. As duas placas receberam 100 µL da suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados foram adicionados. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e posteriormente centrifugados por 5 min a 1440 x g. O sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços (fundo chato) para leitura a 405 nm.

5.7.7 Avaliação da via alternativa

Em placas de 96 poços (fundo V) foram adicionadas 20 µL de cada solução-teste em triplicatas para cada concentração obtida na diluição em série e 50 µL de MHS diluída em HA [diluição determinada pela titulação (1:4), correspondente a 50% de lise] (BOVO *et al.*, 2016). Uma das placas passou por 30 minutos de incubação prévia a 37 °C enquanto a outra não passou por incubação prévia. As duas placas receberam 50 µL da suspensão de eritrócitos de coelho 2,4 % (v/v) em tampão HA. As placas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e posteriormente centrifugados por 5 min a 1440 x g. O sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços (fundo chato) para leitura a 405 nm.

5.7.8 Controles dos ensaios das vias do SC

Tanto a via clássica quanto a alternativa, a percentagem de inibição da hemólise foi obtida considerando como 100% de hemólise a absorbância causada pelo sistema complemento presente no soro, no qual os 40 µL de solução-teste foram substituídos por 40 µL de tampão HC ou 20 µL de tampão HA. Além deste, outros controles foram utilizados, como o controle que se refere a 0% de hemólise, no qual os 100 µL de soro foram substituídos por 100 µL tampão HC ou 50 µL HA; e o controle que se refere à hemólise total, no qual os 100 µL do soro e os 40 µL da solução-teste foram substituídos por 140 µL de água destilada para via clássica e 70 µL para a via alternativa (TABELA 3) (YAMADA *et al.*, 1985a; BOVO *et al.*, 2016).

TABELA 3: CONTROLES UTILIZADOS NO ENSAIO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO.

CONTROLE	RESULTADO ESPERADO	REAGENTES UTILIZADOS
100 % de hemólise causada pelo sistema complemento	% de hemólise = 100 % de hemólise causada pelo complemento	Via clássica: 40 µL de tampão HC + 100 µL de soro humano (fonte de complemento) + 100 µL de solução de eritrócitos Via alternativa: 20 µL de tampão HA + 50 µL de soro humano (fonte de complemento) + 50 µL de solução de eritrócitos
0% de hemólise	0% de hemólise – solução clara e botão de eritrócitos no fundo do poço	Via clássica: 140 µL de tampão HC ou HA + 100 µL de solução de eritrócitos Via alternativa: 70 µL de tampão HA + 50 µL de solução de eritrócitos
Hemólise total	Hemólise total dos eritrócitos em solução – solução nos poços com cor vermelha e ausência de botão de eritrócitos no fundo do poço	Via clássica: 140 µL de água destilada + 100 µL de solução de eritrócitos Via alternativa: 70 µL de água destilada + 50 µL de solução de eritrócitos

FONTE: A autora (2018).

5.7.9 Delineamento experimental e análise estatística

Para os testes de fixação do complemento, os experimentos foram repetidos em triplicata para cada fração nas concentrações a serem testadas. Os dados foram analisados obtendo-se o ICH_{50} no *software* Excel e por meio de análise multifatorial de variância ANOVA e teste de Tukey, considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância $p \leq 0,05$ (VIEIRA, 1991).

6. RESULTADO E DISCUSSÃO

6.1 DOSAGEM DE AGP

O β -GlcY liga-se especificamente a porção AG, entretanto, a estrutura alvo a qual o β -GlcY reage nas AGPs ainda não foi descoberta (VAN HOLST; CLARKE, 1985; ELLIS *et al.*, 2010). BALDWIN e colaboradores (1993) propuseram que a interação entre AGPs e pectinas poderia ser iônica, mediadas pelo cálcio, entre as cadeias laterais da porção

protéica carregadas positivamente e as moléculas carregadas negativamente nas pectinas.

O teor de AGPs foi determinado pelo método de dosagem por difusão radial em gel de agarose descrito por VAN HOLST; CLARKE (1985). No gel é possível verificar o halo resultante da interação do reagente β -GlcY com as AGPs presentes nas amostras W-OP, WOP-D e na WC-OP (FIGURA 15). Já nas amostras AP e WS-OP não se observa o halo, indicando que não há a presença de AGPs. (FIGURA 15a). A FIGURA 14a demonstra uma triagem para verificar a presença ou não de AGPs nas amostras. A FIGURA 15b demonstra o gel usado para a determinação da concentração de AGPs. O diâmetro do halo é proporcional à concentração de AGPs nas frações. O padrão utilizado foi a goma arábica. Os resultados obtidos, expressos em percentagens de AGP em relação à concentração da amostra total, estão apresentados na TABELA 4.

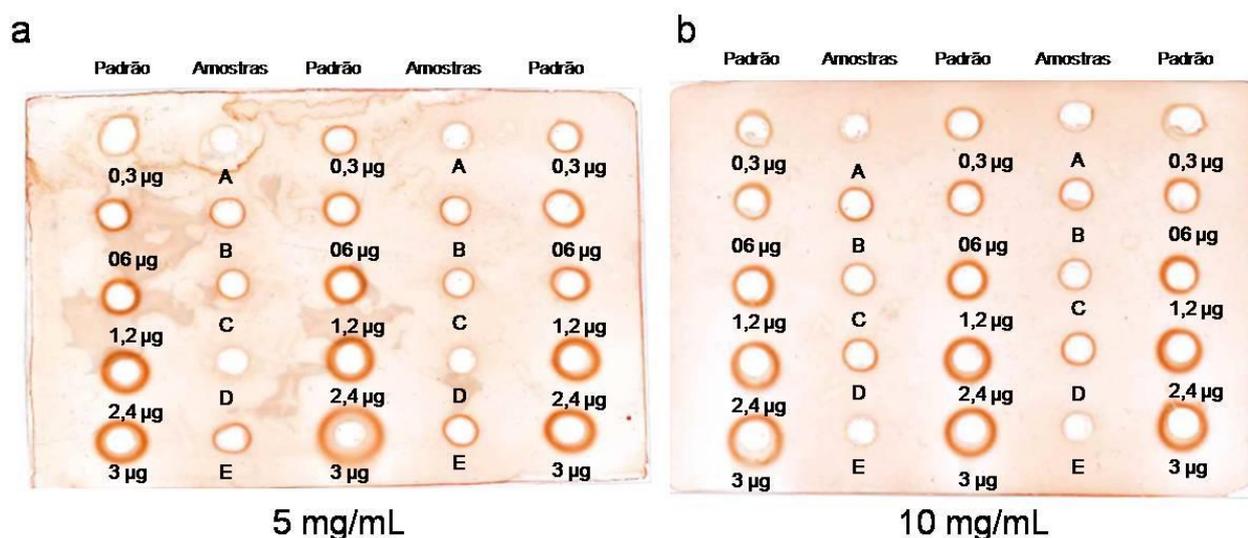


FIGURA 15: Gel de agarose com o reagente β -GlcY para a detecção de AGPs das frações. FONTE: A autora (2018).

LEGENDA: a: A – AP; B – W-OP; C – WC-OP; D – WS-OP; E – WOP-D. b: A – vazio; B – W-OP; C – WC-OP; D – WOP-D; E – vazio.

6.2 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

As frações AP, W-OP, WC-OP, WS-OP, foram analisadas quanto ao teor de carboidratos totais e ácidos urônicos. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.

TABELA 4: ANÁLISE QUÍMICA DAS DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DAS FRAÇÕES DE *Opuntia ficus-indica* E DA FRAÇÃO AP.

	AP	W-OP	WOP-D	WC-OP	WS-OP
Carboidrato Total (%) a	Aproximadamente 100	32	47	38	20
Ácido urônico (%) b	41	19	18	6	8
AGP (%) c	nd	1,36	1,76	0,76	nd

FONTE: A autora (2018).

NOTA: a Determinado pelo método em microensaio fenol-ácido sulfúrico FOX; ROBBIT (1991); b Determinado pelo método em microensaio adaptado de FILISETTI-COZZI; CARPITA (1991) considerando a concentração na amostra total; c: Determinado pelo método difusão radial em gel de agarose descrito por VAN HOLST; CLARKE (1985) e considerando a concentração na amostra total. nd: percentagem de AGP não determinada.

Como se pode ver a amostra AP é a que apresenta maior porcentagem de carboidratos, sendo que quase 50 % é composta de ácido urônico. Já as amostras W-OP e WOP-D possuem 32% e 47% de carboidratos totais, respectivamente. Quanto à porcentagem de ácidos urônicos destas frações, se pode ver que são parecidas. A amostra WC-OP apresentou uma quantidade menor de ácidos urônicos do que a fração W-OP, provando que o procedimento de carboxiredução foi efetivo. A fração WS-OP apresentou porcentagem de carboidratos totais menor do que as outras frações, porém possui um teor de ácidos urônicos próximo ao da WC-OP.

A fração W-OP apresenta 2,6% de grupos acetil (dados cedidos pelo prof^o Luciano H. Campestrini).

6.3 CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE ÁCIDO URÔNICO NAS FRAÇÕES AP E W-OP POR HPAEC-PAD

As duas frações apresentaram ácido urônico em sua composição, mais especificamente o ácido galacturônico, o que pode ser visto por meio da comparação com as posições de eluição dos padrões, que para o GalpA é em torno de 43, 311 (FIGURA 16).

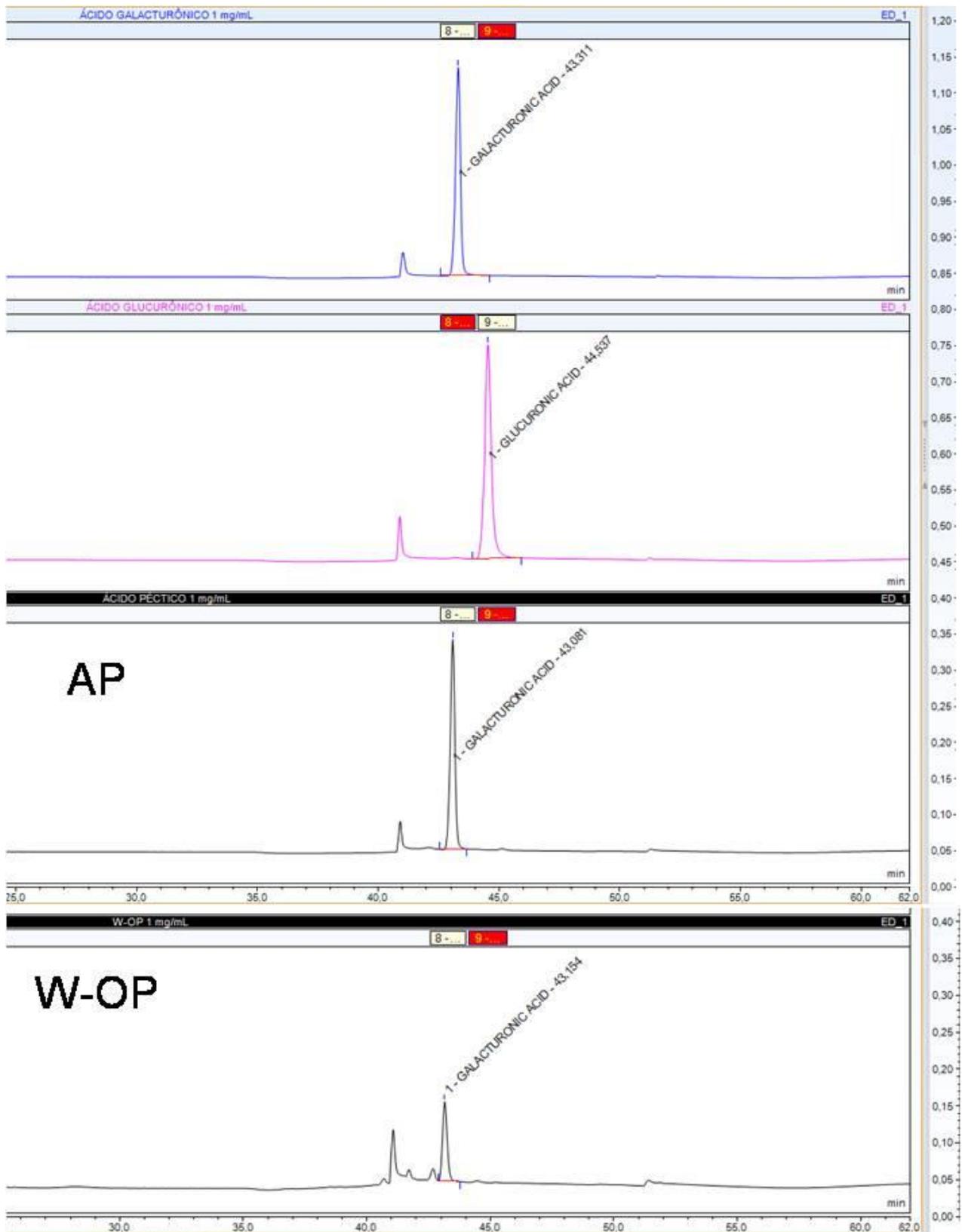


FIGURA 16: Perfil de eluição das frações AP e W-OP e dos padrões GlcAp e GalAp obtido por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD). FONTE: A autora (2018).

6.4 DETERMINAÇÃO DE HOMOGENEIDADE E DA MASSA MOLECULAR DA FRAÇÃO AP POR HPSEC-MALLS/RI

A homogeneidade da fração AP foi avaliada também pelo HPSEC-MALLS/RI. O detector de índice de refração (RI) resulta em um sinal que é proporcional às concentrações presentes na amostra. Já o sinal detectado pelo detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) é dependente da concentração, massa molar e raio de giros das espécies moleculares (VRIESMANN; TEÓFILO; OLIVEIRA-PETKOWICZ, 2011; CAMPESTRINI, 2013).

AP apresentou um grande pico, demonstrado pelo RI, no ângulo de 90° e em torno de 42 a 64 minutos, indicando que ela é uma molécula de caráter homogêneo, como pode ser observado na FIGURA 17. Não foi possível demonstrar o sinal dado pelo MALLS.

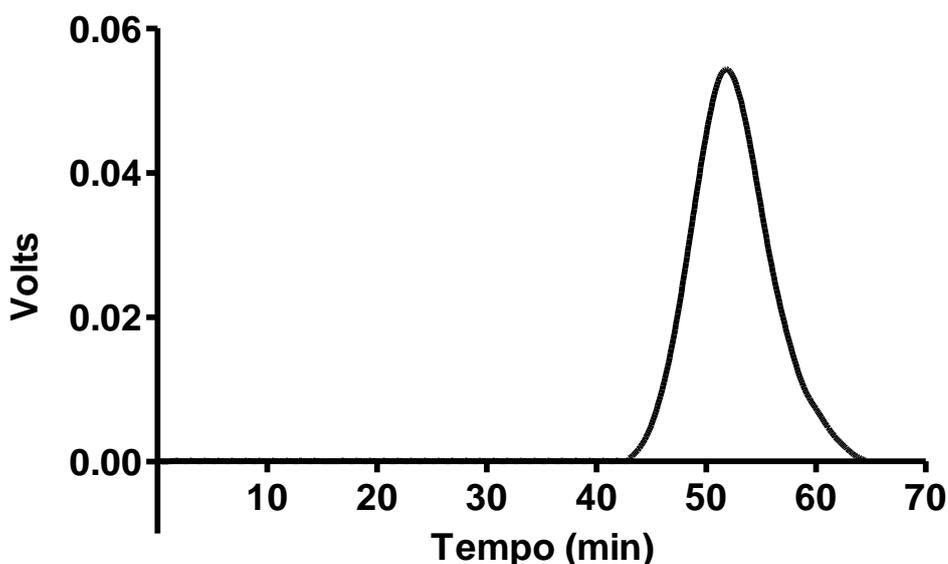


FIGURA 17: Perfil de eluição da fração AP obtido por cromatografia de exclusão estérica de alta resolução (HPSEC) utilizando o detector de índice de refração (RI). FONTE: A autora (2018).

NOTA: A fração AP foi solubilizada em nitrito de sódio 0,1 M contendo azida sódica 200 ppm obtendo-se uma solução de 1 mg/mL. A amostra foi injetada em fluxo de 0,6mL/min a 20 °C e o cromatograma obtido foi analisado em software ASTRA (Wayatt Technology, Massachusetts – EUA).

A fração W-OP apresentou um grande pico (FIGURA 18), tanto demonstrado pelo MALLS como pelo detector de RI, em torno de 30 a 50 min, de caráter polidisperso e homogêneo, indicando a presença de moléculas de altas massas moleculares (dados cedidos pelo prof^o Luciano H. Campestrini).

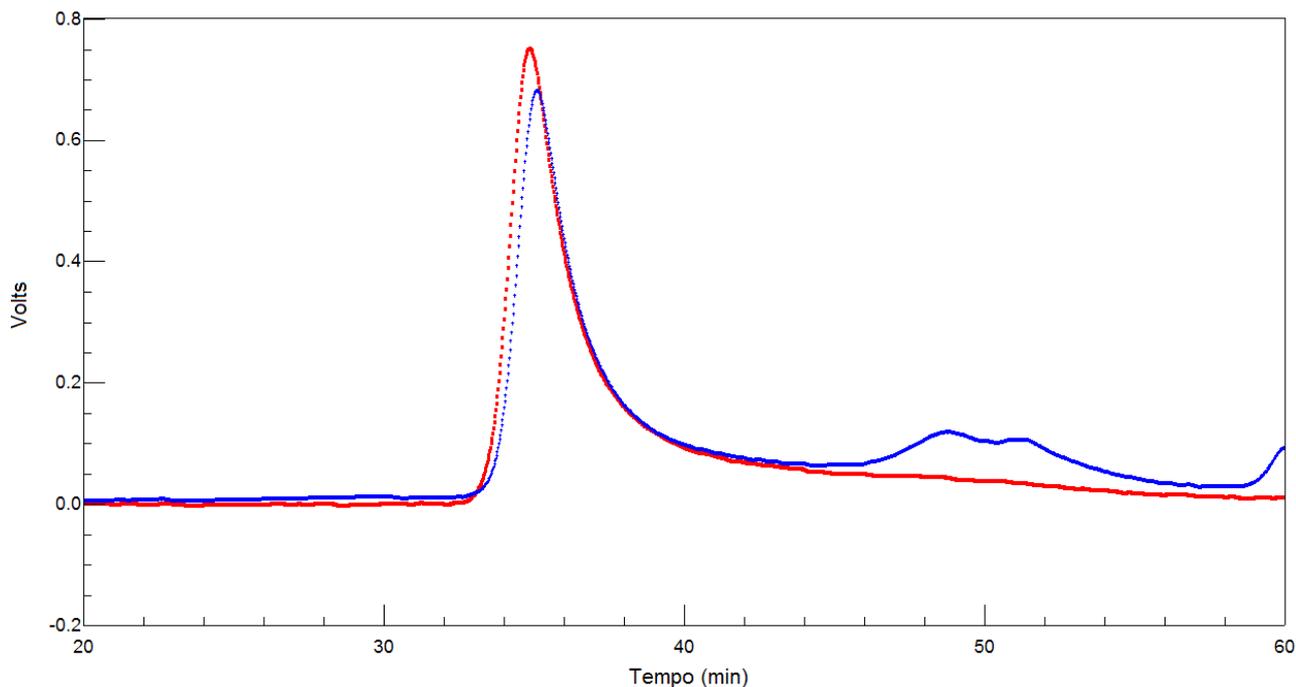


FIGURA 18: Perfil de eluição detectado pelo MALLS/RI da fração W-OP. FONTE: Foto cedida pelo prof^o Luciano H. Campestrini.

NOTA: A fração W-OP foi solubilizada em nitrito de sódio 0,1 M contendo azida sódica 200 ppm obtendo-se uma solução de 1 mg/mL. A amostra foi injetada em fluxo de 0,6mL/min a 20 °C e o cromatograma obtido foi analisado em software ASTRA (Wayatt Technology, Massachusetts – EUA).

Perante o tempo referente ao ponto máximo do pico obtido pelo RI, a massa molecular da fração AP relativa à curva de dextrana comercial foi $4,23 \times 10^3$ g/mol).

Perante o tempo referente ao ponto máximo do pico obtido pelo MALLS/IR, a massa molecular da fração W-OP relativa à curva de dextrana comercial foi $7,14 \times 10^3$ g/mol).

6.5 ANÁLISES DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA DIFUSA (DRI-FT)

A análise de frações pelo DRI-FT gera picos de reflexão que indicam a presença de tipos específicos de ligações, desta forma, demonstrando a presença de grupamentos químicos.

As frações AP, W-OP, WC-OP e WS-OP apresentaram perfis semelhantes. Os espectros das frações polissacarídicas estão demonstrados na FIGURA 19.

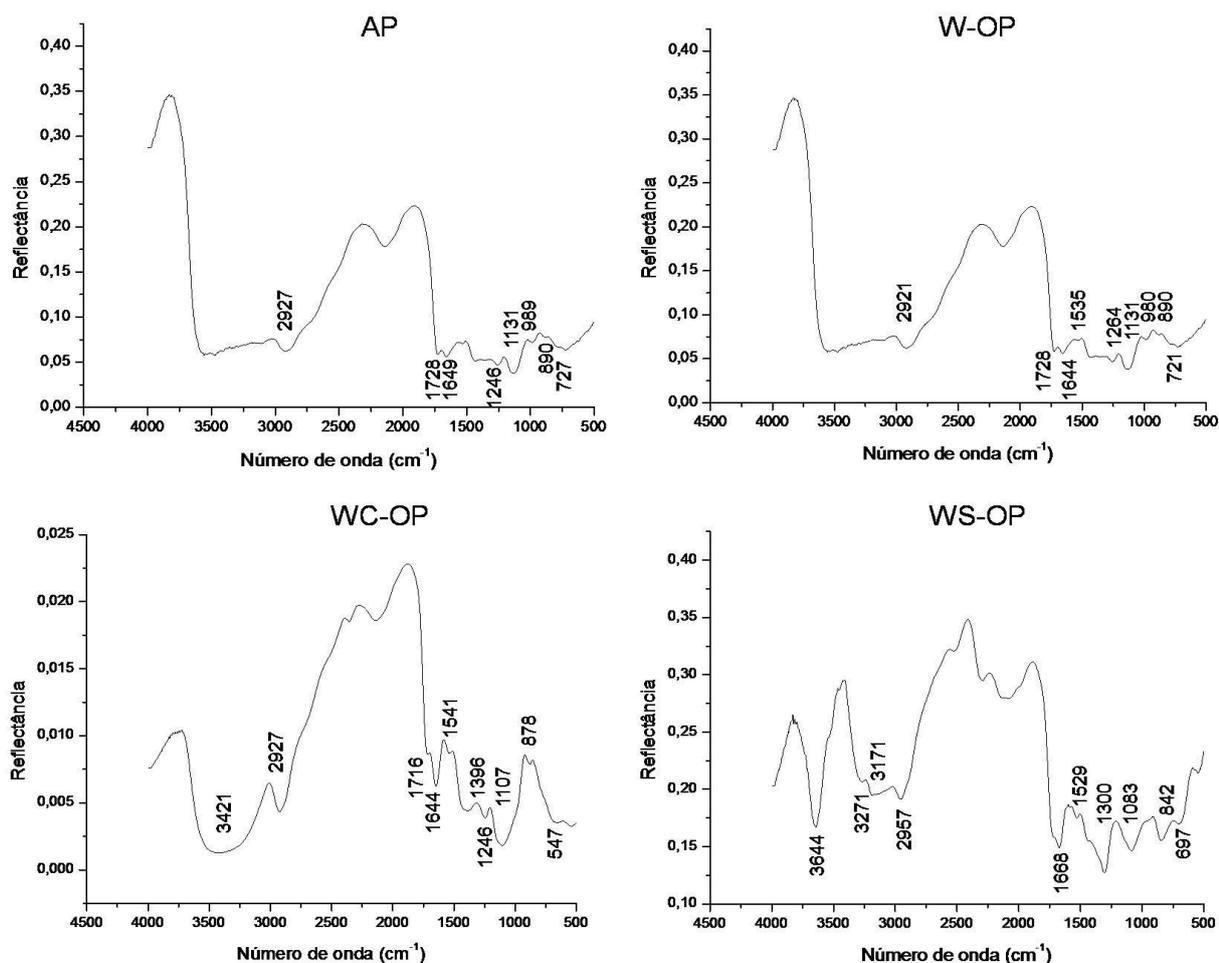


FIGURA 19: Espectros de infravermelho das frações AP, W-OP, WC-OP e WS-OP. FONTE: O autor (2018). NOTA: Amostras analisadas por DRI-FT.

Há a presença de bandas nas quatro frações entre 3000 e 2800 cm^{-1} , o qual é característico de ligações O-H (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 2000; KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001). No caso de amostras de pectina, a absorção na região O-H é devido à ligação de hidrogênio inter e intramolecular do polímero de ácido galacturônico (KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001). Há uma grande banda nas frações WC-OP e WS-OP na região do assinalamento de hidroxilas. No caso da WS-OP é importante ressaltar que a presença de hidroxilas livres em quantidades elevadas serviria de substrato para a ligação da reação de sulfatação (HU *et al.*, 2015), portanto um indicativo da presença dos sulfatos. Em amostras de pectina, o C-H é visto sobreposto à banda O-H em uma faixa de 2500 a 3600 cm^{-1} (KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001). Bandas entre 2950 e 2750 cm^{-1} são esperadas para ligações O-CH₃ devido a ésteres metílicos de ácido galacturônico (KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001), a qual apareceu nas frações AP, W-OP e WC-OP.

A carboxila esterificada é esperada nas bandas de 1760 a 1720 cm^{-1} (KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001), a qual apareceu nas frações AP, W-OP e WC-OP. Já o grupamento COO^- assimétrico aparece em bandas entre 1640 e 1620 cm^{-1} (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 2000), enquanto que a banda em torno de 1417 e/ou 1150 cm^{-1} podem representar o grupamento COO^- simétrico. Nas frações apareceram bandas referentes ao COO^- simétrico. Estas regiões mencionadas, juntamente com a banda em torno de 1104 cm^{-1} , sugerem ácidos urônicos (HORI; SUGIYAMA, 2003), a qual apareceu na fração WC-OP. As frações AP, W-OP e WC-OP apresentaram banda próxima a 1650 cm^{-1} , o qual é característico de grupos COOH (LEFSIH *et al.*, 2016).

Os componentes que formam a ligação glicosídica (C-O-C) aparecem na região entre 1200 a 900 cm^{-1} , a qual é uma região característica para carboidratos (região de *finger print*). Ela se caracteriza pelas vibrações das ligações dos átomos do anel dos carboidratos (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000). Este ponto de *finger print* foi encontrado nas quatro frações.

Também se pode distinguir a ligação quanto a sua anomericidade α ou β , pois geram picos diferentes na região do *finger print*, sendo a banda em torno de 830 a 850 cm^{-1} para conformação α e a banda em torno de 890 cm^{-1} para a conformação β (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000). No caso da fração AP que é uma homogalacturonana, a anomericidade observada é α .

6.6 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DO ^{13}C E DE CORRELAÇÃO ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) – HSQC DAS FRAÇÕES AP, W-OP E WC-OP

As frações AP, W-OP e WC-OP foram submetidas às análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear do ^{13}C e de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) – HSQC com o objetivo de obter mais informações sobre características das estruturas química destas frações. Os assinalamentos obtidos dos espectros foram atribuídos considerando os dados de literatura.

No espectro de RMN- ^{13}C da fração AP os assinalamentos são δ 99,4; 67,7; 68,4; 77,8 e 69,9 PPM, os quais correspondem ao C1; C2; C3; C4; C5 de α -D-GalA, respectivamente. O assinalamento δ 172,0 PPM é atribuído ao -COOH de ácidos urônicos (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015). No espectro de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) da fração AP os assinalamentos δ 4,92/99,8; 3,60/68,0; 3,84/68,3; 4,31/77,8; 4,84/70,4 PPM

correspondem ao H1/C1; ao H2/C2; ao H3/C3; ao H4/C4; ao H5/C5 de α -D-GalA, respectivamente (FIGURA 20) (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015; ROMÁN *et al.*, 2017).

O espectro da fração W-OP apresentou assinalamentos no RMN- ^{13}C de δ 100,9; 70,6; 71,56; 77,5; 72,67, PPM os quais correspondem ao carbono anomérico (C1) de unidades esterificadas de α -D-GalA (1 \rightarrow 4) ligadas (PROVIN, 2012); C2; C3; C4 e C5 do α -D-GalA., respectivamente (MATSUHIRO *et al.*, 2006; PROVIN, 2012; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015). Os assinalamentos δ 104,0; 60,4 PPM correspondem ao carbono anomérico (C1) e C6 de resíduos de β -D-Galp de cadeias laterais; o assinalamento δ 102,98 PPM pode ser atribuído ao C1 de D-Glcp; os assinalamentos δ 109,3; 80,1; PPM correspondem ao C1 e ao C2 da α -L-Araf, respectivamente (CORDEIRO *et al.*, 2012; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015). O deslocamento químico correspondente ao C6 de unidades não esterificadas de α -D-GalpA não está presente na amostra W-OP. No espectro de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) da fração W-OP os assinalamentos δ 3,45/69,0; 3,15/72,5; 3,98/77,3; 3,59/72,9 PPM correspondem ao H2/C2; ao H3/C3; ao H4/C4 e ao H5/C5 de α -D-GalA, respectivamente (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015; ROMÁN *et al.*, 2017). Outros assinalamentos presentes são δ 4,44/104,1; 3,64/60,9; 5,07/109,1; 4,03/81,6; 4,271/103,0 PPM, os quais correspondem ao C1/H1 e C6/H6 da β -D-Galp, ao H1/C1 e H2/C2 da α -L-Araf e ao H1/C1 da β -D-Glcp, respectivamente (FIGURA 21) (CORDEIRO *et al.*, 2012; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015; ROMÁN *et al.*, 2017).

O espectro da fração WC-OP apresentou assinalamentos no RMN- ^{13}C de δ 99,6; 70,7; 71,9; 77,5; 72,7 PPM correspondentes ao carbono anomérico (C1) de unidades esterificadas de α -D-GalA (1 \rightarrow 4) ligadas (PROVIN, 2012), ao C2; C3; C4 e C5 da α -D-GalA., respectivamente (MATSUHIRO *et al.*, 2006; PROVIN, 2012; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015). Os assinalamentos δ 104,1; 60,7 PPM correspondem ao carbono anomérico (C1) e ao C6 livre de resíduos de β -D-Galp de cadeias laterais; δ 103,1 PPM corresponde ao C1 do D-Glcp; os assinalamentos δ 108,8; 81,2 PPM correspondem ao C1 e ao C2 da α -L-Araf, respectivamente (CORDEIRO *et al.*, 2012; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015). O deslocamento químico correspondente ao C6 de unidades não esterificadas de α -D-GalpA não está presente na amostra WC-OP. No espectro de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) da fração WC-OP os assinalamentos δ 3,82/68,6; 3,15/72,7; 3,97/77,9; 3,59/72,9 PPM correspondem ao H2/C2; ao H3/C3; ao H4/C4 e ao H5/C5 de α -D-GalA, respectivamente (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015; ROMÁN *et al.*, 2017). Outros assinalamentos presentes são δ 4,26/103,0; 3,64/60,9; 5,09/108,9; 4,04/81,6; 4,44/103,9 PPM, os quais correspondem ao C1/H1 e C6/H6 da β -D-Galp, ao H1/C1 e H2/C2 da α -L-Araf e ao H1/C1 da β -D-Glcp,

respectivamente (FIGURA 22) (CORDEIRO *et al.*, 2012; CANTU-JUNGLES *et al.*, 2015; ROMÁN *et al.*, 2017). Os assinalamentos estão resumidos na TABELA 6.

Não foi possível obter um espectro da fração WS-OP

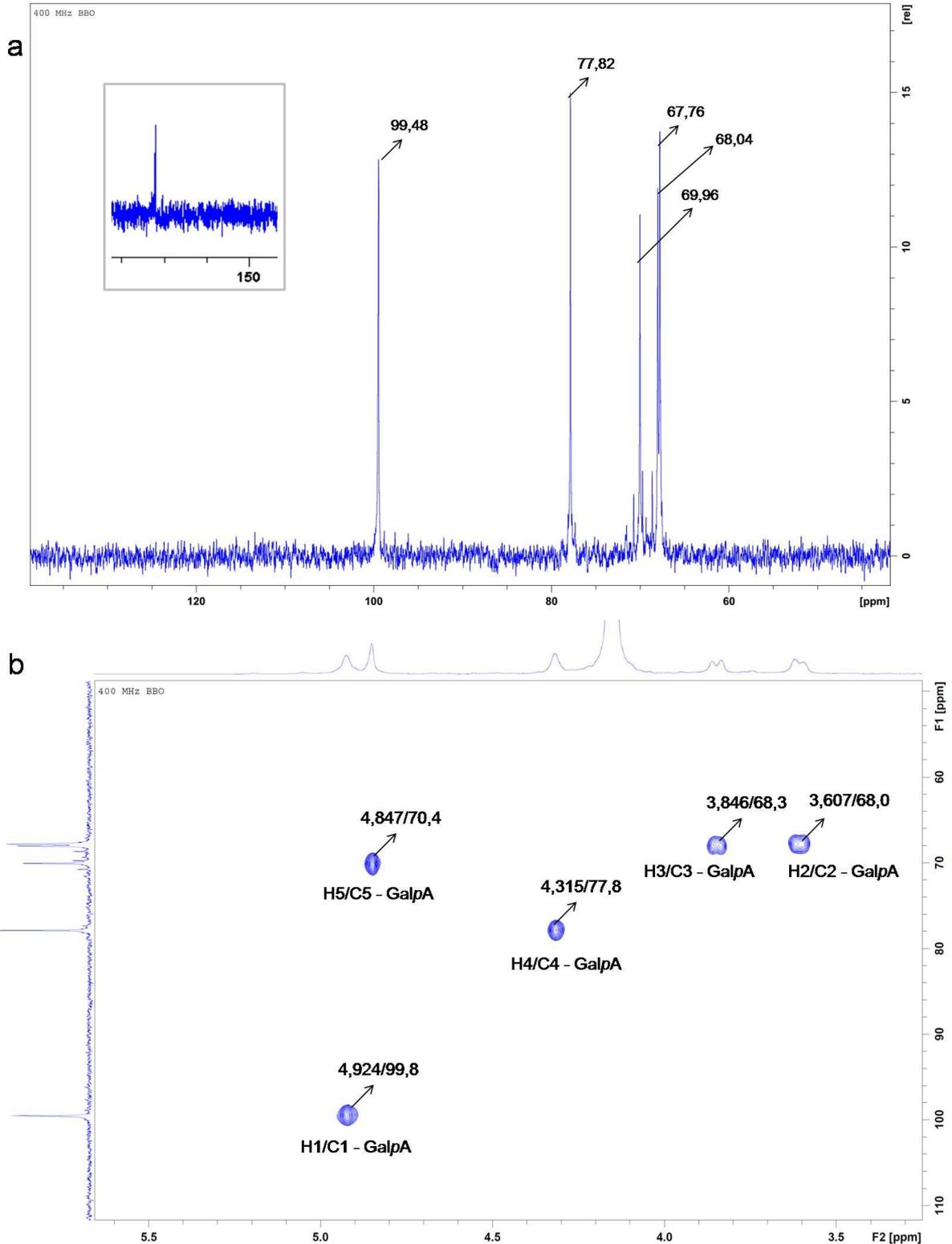


FIGURA 20: a: Espectro parcial de ^{13}C da fração AP. b: Espectro de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) da fração AP. FONTE: A autora (2018).

NOTA: Amostra solubilizada em D₂O.

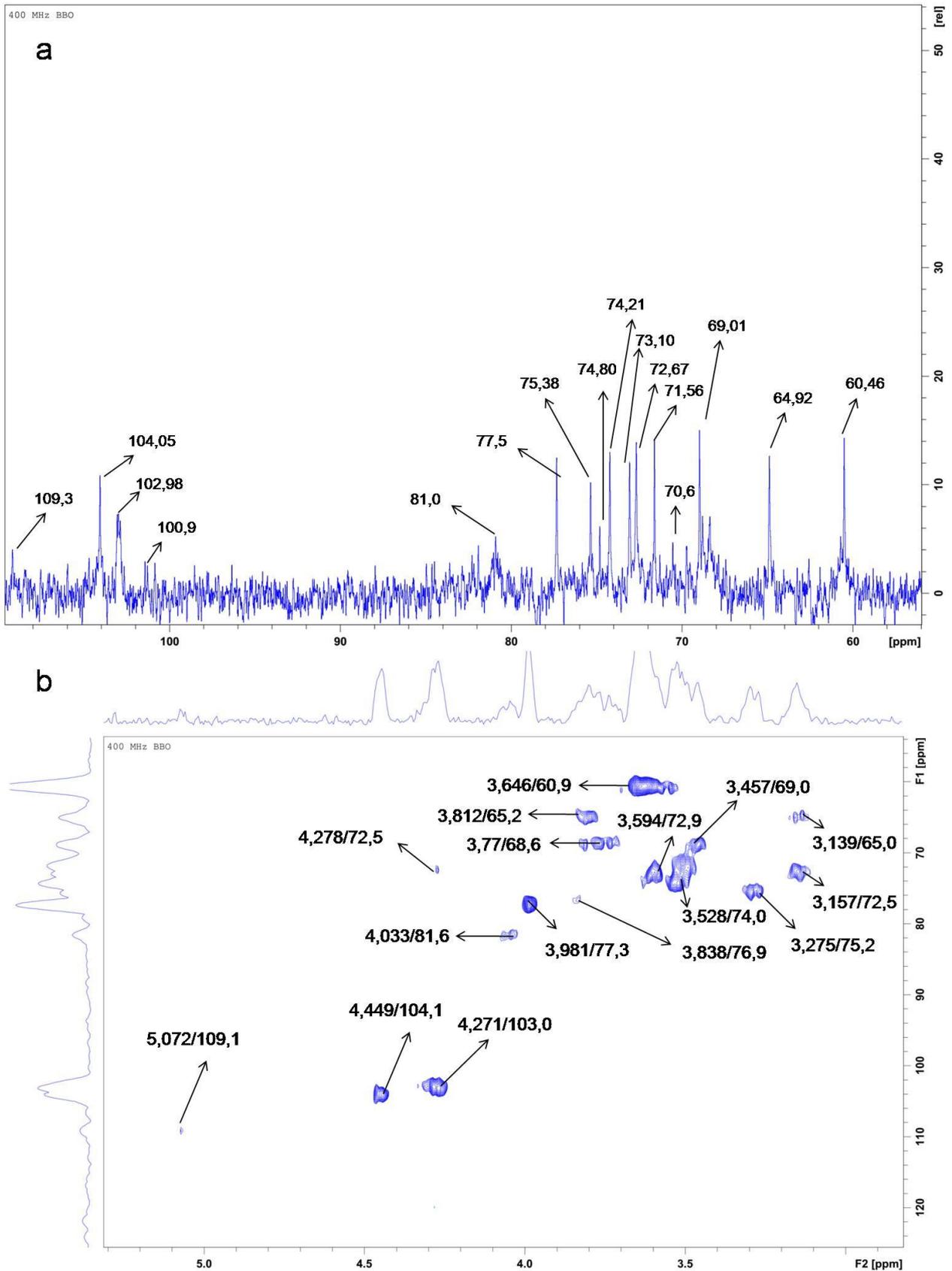


FIGURA 21: a: Espectro parcial de ^{13}C da fração W-OP. b: Espectro de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) da fração W-OP. FONTE: A autora (2018).

NOTA: Amostra solubilizada em D_2O .

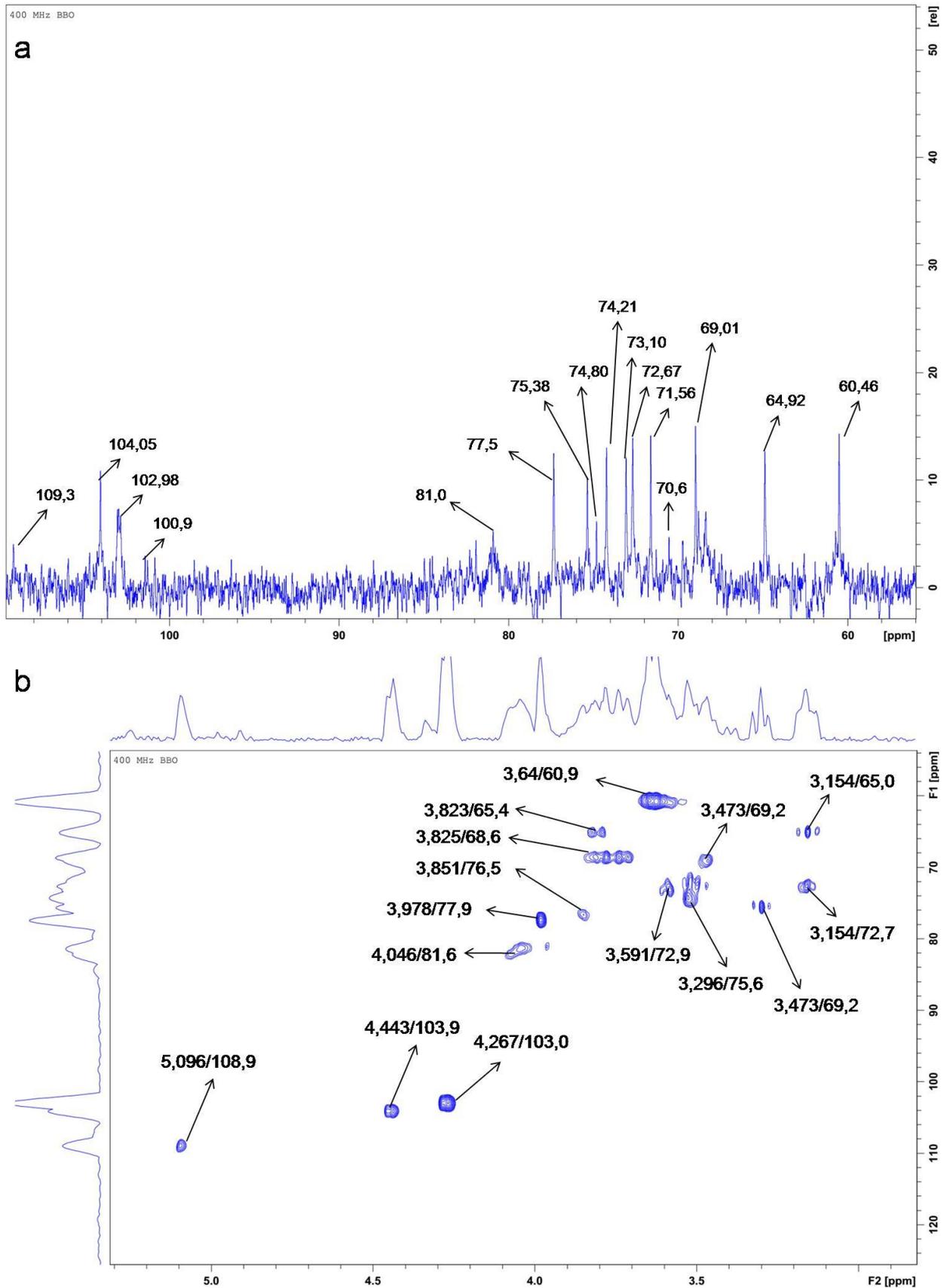


FIGURA 22: a: Espectro parcial de ^{13}C da fração WC-OP. b: Espectro de correlação ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) da fração WC-OP. FONTE: A autora (2018).

NOTA: Amostra solubilizada em D_2O .

TABELA 5: ASSINALAMENTO DA ANÁLISE DE ^{13}C E DA ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$) - HSQC DAS FRAÇÕES AP, W-OP E WC-OP.

	Assinalamentos			Correlação de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$	^{13}C	Assinalamentos			^{13}C das unidades monossacarídicas
	AP	W-OP	WC-OP			AP	W-OP	WC-OP	
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	4,92/99,8	--	--	H1/C1 de $\alpha\text{-D-GalpA}$	^{13}C	99,4	100,9	99,6	C1 de $\alpha\text{-D-GalpA}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	3,60/68,0	3,45/69,0	3,82/68,6	H2/C2 de $\alpha\text{-D-GalpA}$	^{13}C	67,7	70,6	70,7	C2 de $\alpha\text{-D-GalpA}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	3,84/68,3	3,15/72,5	3,15/72,7	H3/C3 de $\alpha\text{-D-GalpA}$	^{13}C	68,4	71,5	71,9	C3 de $\alpha\text{-D-GalpA}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	4,31/77,8	3,98/77,3	3,97/77,9	H4/C4 de $\alpha\text{-D-GalpA}$	^{13}C	77,8	77,5	77,5	C4 de $\alpha\text{-D-GalpA}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	4,84/70,4	3,59/72,9	3,59/72,9	H5/C5 de $\alpha\text{-D-GalpA}$	^{13}C	69,9	72,6	72,7	C5 de $\alpha\text{-D-GalpA}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	--	--	--	H6/C6 de $\alpha\text{-D-GalpA}$	^{13}C	172,0	--	--	C6 de $\alpha\text{-D-GalpA}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	--	4,44/104,1	4,26/103,0	H1/C1 de $\beta\text{-D-Galp}$	^{13}C	--	104,0	104,1	C1 de $\beta\text{-D-Galp}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	--	3,64/60,9	3,64/60,9	H6/C6 de $\beta\text{-D-Galp}$	^{13}C	--	60,4	60,7	C6 de $\beta\text{-D-Galp}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	--	5,07/109,1	5,09/108,9	H1/C1 de $\alpha\text{-D-Araf}$	^{13}C	--	109,3	108,8	C1 de $\alpha\text{-L-Araf}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	--	4,03/81,6	4,04/81,6	H2/C2 de $\alpha\text{-D-Araf}$	^{13}C	--	80,1	81,2	C2 de $\alpha\text{-L-Araf}$
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	--	4,27/103,0	4,44/103,9	H1/C1 de $\beta\text{-D-Glcp}$	^{13}C	--	102,9	103,1	C1 de $\beta\text{-L-Glcp}$

FONTE: A autora (2018).

6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIXADORA DO SISTEMA COMPLEMENTO DAS FRAÇÕES DE *Opuntia ficus-indica* E DA FRAÇÃO AP

Como já se sabe o SC atua de forma a destruir organismos invasores e conferir a ponte entre imunidade inata e adaptativa na defesa do organismo. Porém, tanto a inibição quanto a ativação do SC representam atividades importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos. Muitos compostos provenientes de fontes naturais já são conhecidos por interagir com esse sistema como, por exemplo, polissacarídeos sulfatados, polissacarídeos pécticos e glucanas (ALBAN *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2015).

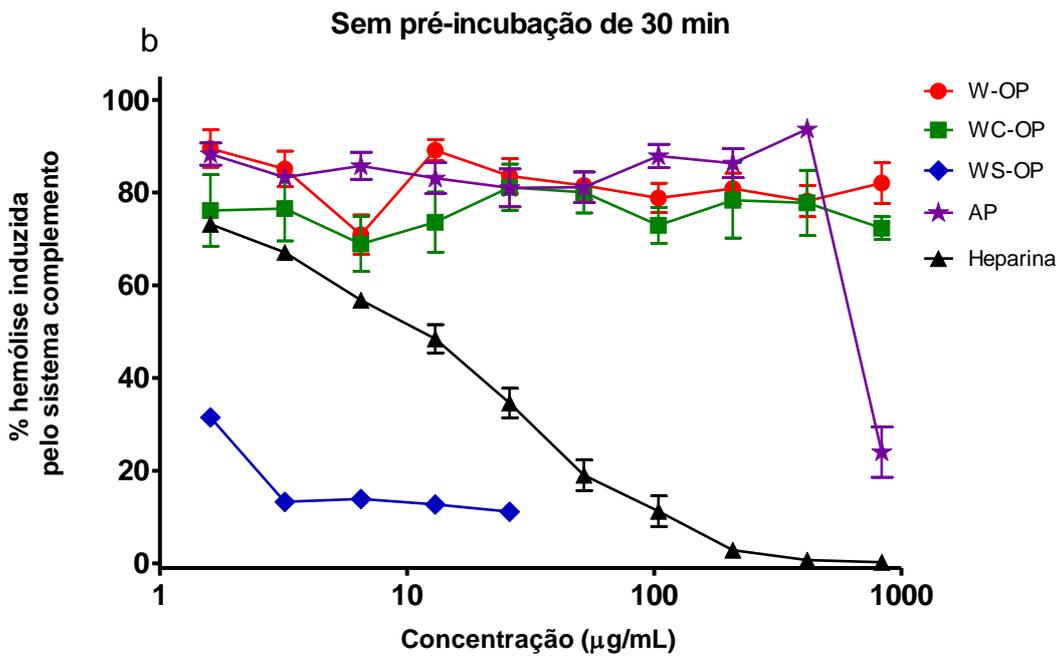
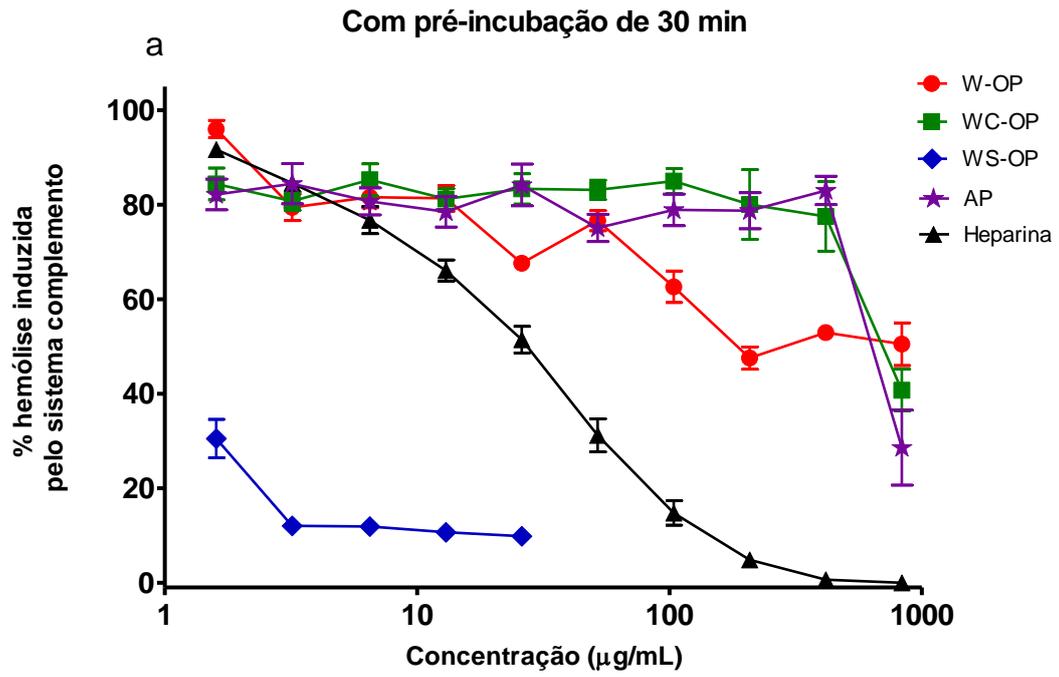
As frações em estudo foram testadas para verificar qualquer interação com as proteínas do sistema complemento e se essa interação é capaz de alterar a hemólise dos eritrócitos. Para avaliar o possível efeito sobre a via clássica e a via alternativa foi realizado o ensaio hemolítico descrito por YAMADA e colaboradores (1985a), com modificações sugeridas por ALBAN e colaboradores (2002). Como controle positivo de inibição utilizou-se a heparina bovina. Quando o ensaio realizado de maneira

convencional há a inibição da hemólise aparente tanto se a molécula testada é ativadora ou inibidora. Portanto, com o ensaio adaptado utilizando incubação prévia, é possível inferir se as frações testadas atuam como compostos inibidores ou ativadores do complemento. Para melhor comparar as frações que tiveram efeito sobre o sistema complemento, foi feito o cálculo do ICH_{50} , assim como para o controle de inibição (heparina).

A fração W-OP apresentou efeito sobre o SC, contudo, o efeito foi baixo comparando seu ICH_{50} de 208,84 $\mu\text{g/mL}$ com o ICH_{50} de 23 $\mu\text{g/mL}$ apresentado pela heparina, ambos na via clássica com incubação. A partir da concentração 52 $\mu\text{g/mL}$, a W-OP induziu a inibição de hemólise efetiva à medida que há o aumento da concentração até 208 $\mu\text{g/mL}$. Como não foi possível calcular o ICH_{50} no experimento sem incubação, sugere-se neste caso uma ação ativadora do complemento, a qual pode ser explicada pela inibição da hemólise aparente somente no ensaio com pré-incubação. Isso ocorre devido ao consumo do complemento durante os 30 minutos de pré-incubação, não havendo mais proteínas da cascata disponíveis para agir sobre os eritrócitos de carneiro quando estes são posteriormente adicionados (FIGURA 23).

Nos ensaios com a fração WS-OP foi necessário acrescentar cinco concentrações na diluição em série da amostra (0,814; 0,407; 0,203; 0,102 e 0,051 $\mu\text{g/mL}$) retirando as cinco primeiras concentrações (833; 416; 208; 104; 52 $\mu\text{g/mL}$). O ICH_{50} desta fração de 1,676 $\mu\text{g/mL}$ se apresentou significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparada com a heparina e demonstrou ter um efeito maior do que a heparina (23 $\mu\text{g/mL}$). No ensaio da via clássica com incubação. No experimento sem incubação o ICH_{50} de WS-OP (1,443 $\mu\text{g/mL}$) também foi significativamente diferente ($p < 0,05$) quando comparada com a heparina (ICH_{50} de 10 $\mu\text{g/mL}$) e também demonstrou ser mais eficaz do que a heparina. A partir das concentrações 0,208 e 0,814 $\mu\text{g/mL}$, com e sem pré-incubação respectivamente, a WS-OP apontou inibição de hemólise efetiva à medida que há o aumento da concentração se mantendo constante a partir de 3,2 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado sugere uma ação inibidora de WS-OP (FIGURA 23).

As frações AP e WC-OP apresentaram perfis semelhantes nos ensaios com e sem pré-incubação sugerindo que estas frações não apresentam atividade sobre a via clássica do sistema complemento. Além disso, não foi possível calcular um ICH_{50} para estas frações o que reforça a não atividade destas frações na via clássica.



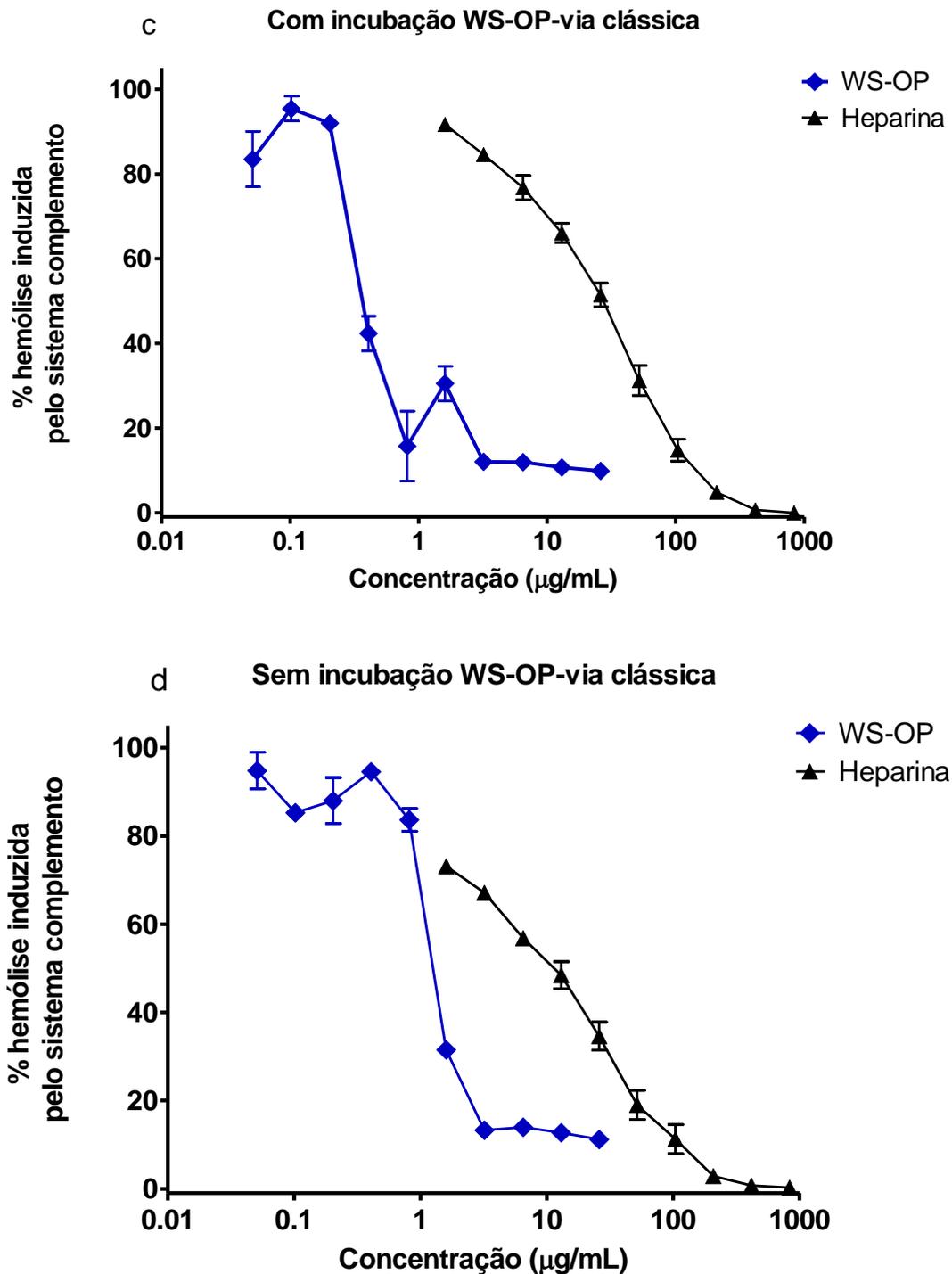
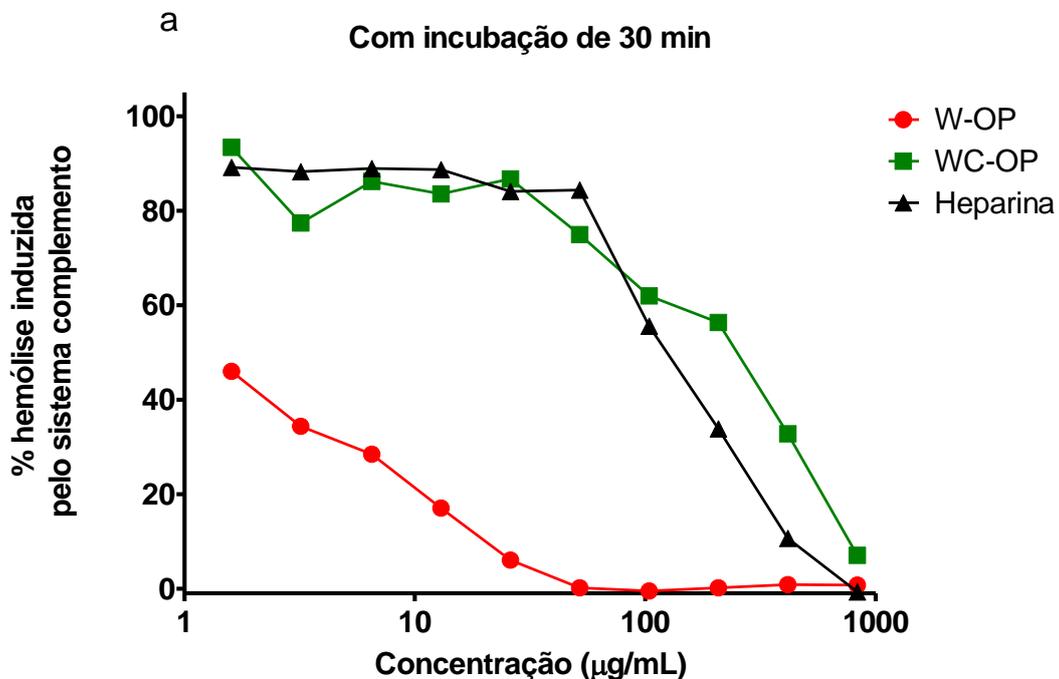


FIGURA 23: Efeito das frações AP, W-OP, WC-OP E WS-OP de *Opuntia ficus-indica*, e da heparina sobre a hemólise induzida pela via clássica do sistema complemento. (a) e (c) com pré-incubação. (b) e (d) sem pré-incubação de 30 minutos das frações-teste com a MHS. FONTE: A autora (2018).

NOTA: Ensaio hemolítico do complemento utilizando suspensão de eritrócitos de carneiro a 1,2%, sensibilizadas por 30 minutos a 37°C com hemolisina (1:1500 v/v). As concentrações finais de AP, W-OP, WC-OP e hemolisina testadas foram 1,6; 3,2; 6,5; 13; 26; 52; 104; 208; 416 e 833 µg/mL e para a fração WS-OP foram 26; 13; 6,5; 3,2; 1,6; 0,814; 0,407; 0,203; 0,102 e 0,051 µg/mL As frações foram ou não pré-incubadas a 37°C por 30 minutos com a MHS (fonte de complemento). Em seguida, adicionou-se a suspensão de eritrócitos de carneiro, e as soluções foram novamente incubadas por mais 30 minutos a 37°C. Todas as soluções utilizadas no experimento foram diluídas em HC. 100% de hemólise corresponde à atividade hemolítica do complemento na ausência de amostra, medida após a pré-incubação. Os valores de ICH₅₀ correspondem à concentração final das frações em µg/mL capazes de reduzir a atividade hemolítica da MHS em 50%.

Com relação ao ensaio hemolítico do complemento por meio da via alternativa, as amostras também foram testadas com e sem incubação prévia. A fração W-OP apresentou efeito sobre o SC, contudo quando comparado com a heparina o efeito foi maior, como pode ser visto pelo seu ICH_{50} de 1,124 mg/mL ($p < 0,001$) em relação ao da heparina, de 131,5 mg/mL (ambos da via alternativa com incubação). A W-OP apresentou inibição de hemólise mais efetiva à medida que há o aumento da concentração, até a concentração de 52 $\mu\text{g/mL}$ se mantendo constante até a maior concentração. Como novamente não foi possível calcular o CH_{50} no experimento sem incubação, sugere-se ação ativadora do complemento pelo mesmo motivo explicado anteriormente (FIGURA 24).

A amostra WC-OP apresentou efeito sobre o SC, contudo quando comparado com a heparina o efeito foi menor, como pode ser visto pelo seu ICH_{50} de 278,15 mg/mL ($p < 0,001$). A heparina apresentou ICH_{50} de 131,5 mg/mL, ambos na via alternativa com incubação. A fração WC-OP demonstrou inibição de hemólise mais efetiva à medida que há o aumento da concentração a partir de 26 $\mu\text{g/mL}$. Nesse caso também não foi possível calcular o ICH_{50} no experimento sem incubação, sugerindo uma ação ativadora do complemento.



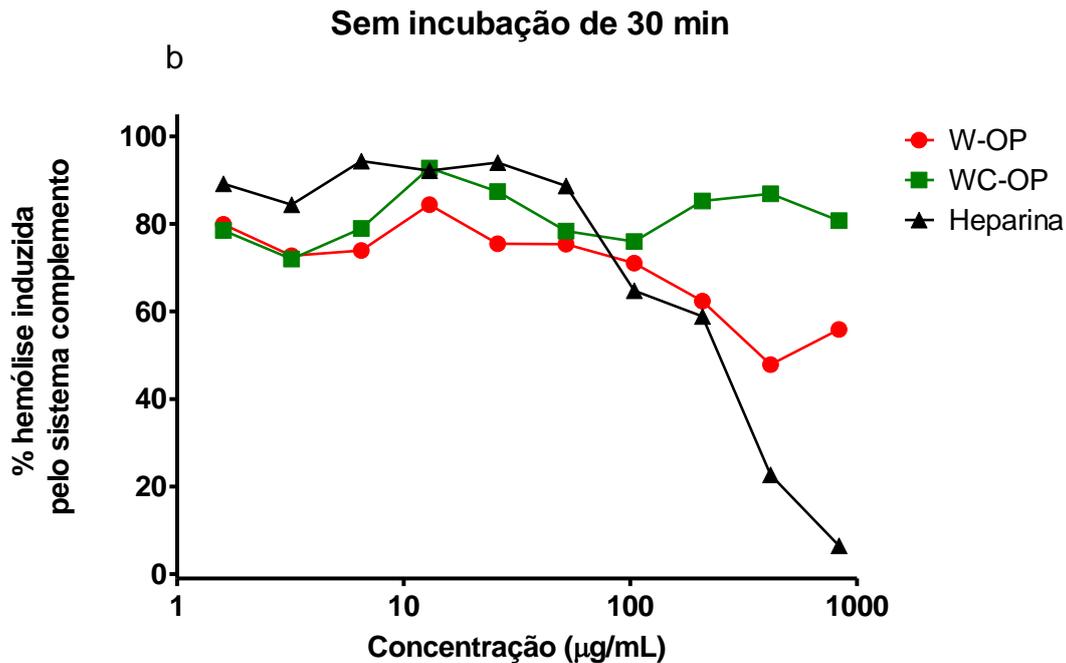


FIGURA 24: Efeito das frações W-OP e WC-OP de *Opuntia ficus-indica*, e da heparina sobre a hemólise induzida pela via alternativa do sistema complemento. (a) com pré-incubação. (b) sem pré-incubação de 30 minutos das frações-teste com a MHS. FONTE: O autor (2018).

NOTA: Ensaio hemolítico do complemento utilizando suspensão de eritrócitos de coelho a 2,4%. As concentrações finais das frações testadas foram 1,6; 3,2; 6,5; 13; 26; 52; 104; 208; 416 e 833 µg.mL⁻¹. As frações foram ou não pré-incubadas a 37°C por 30 minutos com a MHS (fonte de complemento). Em seguida, adicionou-se a suspensão de eritrócitos de coelho, e as soluções foram novamente incubadas por mais 30 minutos a 37°C. Todas as soluções utilizadas no experimento foram diluídas em HA. 100% de hemólise corresponde à atividade hemolítica do complemento na ausência de amostra, medida após a pré-incubação. Os valores de ICH₅₀ correspondem à concentração final das frações em µg/mL capazes de reduzir a atividade hemolítica da MHS em 50%.

Os valores de ICH₅₀ calculados correspondem à concentração final das frações-teste (µg/mL) capaz de reduzir a atividade hemolítica da mistura de soro humano (MHS) em 50%. Quanto menor o ICH₅₀, mais potente é o composto em inibir a hemólise. As curvas de inibição de hemólise obtidas para a heparina (FIGURA 21 e 22) mantêm o mesmo padrão nos gráficos com e sem pré-incubação de cada via testada. Tanto nas menores, quanto nas maiores concentrações, a heparina mostrou maior capacidade de inibir a hemólise com o aumento da concentração. As curvas de inibição da hemólise derivadas da atividade da heparina com e sem pré-incubação apresentaram respectivamente ICH₅₀ de 23 e 10 µg/mL para a via clássica e de 131,5 e 241 µg/mL para a via alternativa. Este resultado confirma que a heparina atua como inibidor da via clássica e da via alternativa do sistema complemento (ALBAN *et al.*, 2002). A relação das estruturas das frações testadas juntamente com o ICH₅₀ pode ser visualizada na TABELA 6.

TABELA 6: RELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E OS VALORES DE ICH₅₀ DAS FRAÇÕES TESTADAS DE *Opuntia ficus-indica*, DA FRAÇÃO AP E DA HEPARINA NAS VIAS CLÁSSICA E VIA ALTERNATIVA.

		ICH ₅₀ (µg/mL)				
		AP	W-OP	WC-OP	WS-OP	Heparina
Via clássica	Com incubação	nd	166	nd	1,67	23
	Sem incubação	nd	nd	nd	1,44	10
Via alternativa	Com incubação	--	1,12	278	--	131
	Sem incubação	--	nd	nd	--	241
Estrutura		Homogalacturonana	Homogalacturonana com cadeias de galactana e arabinogalactana	Galactana e arabinogalactana	Homogalacturonana com cadeias de galactana e arabinogalactana	Polissacarídeo sulfatado
Características químicas	Mw	4,23 (x 10 ³ g/mol)	7,14 (x 10 ³ g/mol)	-	-	-
	% ácidos urônicos	41	19	6	8	-
	% acetil	-	2,6	-	-	-
	% sulfato	-	-	-	44,77	-
	% AGP	-	1,36	0,76	-	-

FONTE: A autora (2018).

NOTA: nd: ICH₅₀ não determinado; -: parâmetro não calculado; --: frações não testadas.

Como as análises para caracterização das frações testadas da *Opuntia ficus-indica* sugerem que sejam AGs e que nas as frações W-OP e WC-OP há a presença de AGPs pode-se inferir que essas moléculas possam estar interferindo no complemento ao se ligarem ao componente C1q, assim como outros ativadores da via clássica. Dessa forma, a AGP induz a clivagem do C3, o que pode levar à ativação tanto da via clássica quanto da via alternativa, levando à formação do MAC (ODENTHAL *et al.*, 2000; ALBAN *et al.*, 2002), componente responsável pela lise celular. Assim, a presença das AGPs pode estar contribuindo para os efeitos apresentados.

Alguns estudos demonstraram que os açúcares ácidos presentes interferem na modulação da via alternativa do complemento (YAMADA *et al.*, 1985b). Como há a presença de açúcares ácidos em todas as frações pode-se dizer que eles podem estar contribuindo para a atividade das frações da *Opuntia ficus-indica*. Outro detalhe é que já se observou que a quantidade de açúcares neutros presentes nas cadeias laterais de pectinas é importantes para a atividade biológica apresentada por essas moléculas (ALBAN *et al.*, 2002). Por exemplo, já foi demonstrado que a quantidade de unidades de galactose β-(1,6) e β-(1,3,6) ligadas e ao baixo teor de ácido galacturônico α-(1,4)-ligado está relacionado a atividade de pectinas de *Brassica oleracea* (SAMUELSEN *et al.*, 2007).

7. CONCLUSÕES

- A fração AP possui as características de uma homogalacturonana, ou seja, um polissacarídeo ácido composto por unidades de α -D-GalpA, com Mw de 4,23 (x 103 g/mol) que não apresentou atividade sobre a via clássica do sistema complemento.
- A fração W-OP apresenta características químicas de uma fração polissacarídica ácida com a presença de arabinose e galactose além do ácido galacturônico, o que sugere que é uma homogalacturonana com cadeias de galactana e arabinogalactana, com Mw de 7,14 (x 103 g/mol), que apresentou atividade ativadora sobre o sistema complemento, sendo potente em relação a via alternativa. Os motivos estruturais que podem estar envolvidos com a atividade sobre o sistema complemento podem estar nas cadeias laterais.
- A fração WC-OP apresenta estrutura semelhante à nativa, porém com conteúdo de ácido urônico 3 vezes menor. Pode-se sugerir que o menor conteúdo de ácido urônico influenciou na atividade sobre o SC uma vez que esta fração não teve efeito sobre a via clássica e teve um efeito menor sobre a alternativa comparada com a fração nativa.
- A fração WS-OP possui grupos sulfatos que são importantes para a atividade inibidora sobre a via clássica do sistema complemento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª Edição. Brasil: Editora Elsevier, 2008.

ADLI, B.; BOUTEKRABT, A.; TOUATI, M.; BAKRIA, T.; TOUATI, A.; BEZINI, E. Phenotypic diversity of *Opuntia ficus indica* (L.) MILL. in the Algerian steppe. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 66–74, 2017.

ALBAN, S.; CLASSEN, B.; BRUNNER, G.; BLASCHEK, W. Differentiation between the complement modulating effects of an arabiogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. **Planta medica**, v. 68, p. 1118-1124, 2002.

ALBUQUERQUE, P.; COELHO, L. C.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Approaches in biotechnological applications of natural polymers. **AIMS Molecular Science**, v. 3, n. 3, p. 386-425, 2016.

AMARA, U.; FLIERL, M. A.; RITTIRSCH, D.; KLOS, A.; CHEN, H.; ACKER, B.; BRUCKNER, U. B.; NILSSON, B.; GEBHARD, F.; LAMBRIS, J. D.; HUBER-LANG, M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. **Journal of immunology**, v. 185, p. 5628–5636, 2010.

ARAÚJO, C. A. **Modificações químicas em carragenanas: estudo comparativo de diversos padrões de sulfatação na atividade anticoagulante**. 124 f. (Dissertação em Bioquímica e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ASTELLO-GARCÍA, M. G.; CERVANTES, I.; NAIR, V.; SANTOS-DÍAZ, M. S.; REYES-AGUERO, A.; GUÉRAUD, F.; NEGRE-SALVAYRE, A.; ROSSIGNOL, M.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; DE LA ROSA, A. P. B. Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia spp.* cultivars with different domestication gradient **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 43, p. 119–130, 2015.

AUSTARHEIM, I.; CHRISTENSEN, B. E.; AAS, H. T. N.; THÖLE, C.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. T. Chemical characterization and complement fixation of pectins from *Cola cordifolia* leaves. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 472-480, 2014.

BALDWIN, T. C.; MCCANN, M. C.; ROBERTS, K. A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan-protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. **Journal of Plant Physiology**, vol. 103, p. 115-123, 1993.

BAYLY-JONES, C.; BUBECK, D.; DUNSTONE, M. A. The mystery behind membrane insertion: a review of the complement membrane attack complex. **Philosophical Transactions B**, p. 1-9, 2017.

BENTO, J. F.; NOLETO, G. R.; PETKOWIC, C. L. O. Isolation of an arabinogalactan from *Endopleura uchi* bark decoction and its effect on HeLa cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 871–877, 2014.

BOTTO, M.; KIRSCHFINK, M.; MACOR, P. PICKERING, M. C.; WÜRZNER, R.; TEDESCO, F. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 2774–2783. 2009.

BOVO, F.; LENZI, R. M.; YAMASSAKI, F. T.; MESSIAS-REASON, I. J.; CAMPESTRINI, L. H.; STEVAN, F. R.; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F. MAURER, J. B. B. Modulating effects of arabinogalactans from plant gum exudates on human complement system. **Experimental Immunology**, v. 83, p. 314-320, 2016.

CAMPESTRINI, L.H. **Estrutura química, propriedades reológicas e atividades biológicas de carboidratos obtidos de *Aloe barbadensis* Miller**. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CANTU-JUNGLES, T. M.; ALMEIDA, C. P.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. C.; CORDEIRO, L. M. C. Arabinan-rich pectic polysaccharides from buriti (*Mauritia flexuosa*): An Amazonian edible palm fruit. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 276–281, 2015.

CARROLL, M. V.; SIM, R. B. Complement in health and disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 965-975, 2011.

CHOUGUI, N.; TAMENDJARI, A.; HAMIDJ, W.; HALLAL, S.; BARRAS, A.; RICHARD, T.; LARBAT, R. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. **Food Chemistry**, v. 139, p. 796–803, 2013.

COELHO, M. T. **Pectina: Características e Aplicações em Alimentos**. Trabalho acadêmico (Disciplina de Seminários em alimentos) - Bacharelado em Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CONTRERAS-PADILLA, M.; PÉREZ-TORRERO, E.; HERNÁNDEZ-URBIOLA, M. I.; HERNÁNDEZ-QUEVEDO, G.; DEL REAL, A.; RIVERA-MUÑOZ, E. M.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, M. E. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. Redonda) at different maturity stages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 38–43, 2011.

CORDEIRO, L. M. C.; REINHARDT, V. F.; BAGGIO, V. H.; WERNER, M. F. P.; BURCI, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Arabinan and arabinan-rich pectic polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds: Structure and gastroprotective activity. **Food Chemistry**, v. 130, p. 937–944, 2012.

DE JONG, H. K.; VAN DER POLL, T.; WIERSINGA, W. J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, p. 422–430, 2010.

DI LORENZO, F.; SILIPO, A.; MOLINARO, A.; PARRILLI, M.; SCHIRALDI, C.; D'AGOSTINO, A.; IZZO, E.; RIZZA, L.; BONINA, A.; BONINA, F.; LANZETTA, R. The polysaccharide and low molecular weight components of *Opuntia ficus indica* cladodes: Structure and skin repairing properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 128–136, 2017.

DOGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. **The Biochemical Journal**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Biochemistry**, vol. 28, p. 350-356, 1956.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, p. 34-50, 2010.

EDENS, R. E.; LINHARDT, R. J. WEILER, J. M. Heparin is not just an anticoagulant anymore: six and one half decades of studies on the ability of heparin to regulate complement activity. **Complem Prof**, v. 1, p. 96–120, 1993.

EISENREICH, W., RUDEL, T., HEESEMANN, J., GOEBEL, W. To eat and to be eaten: mutual metabolic adaptations of immune cells and intracellular bacterial pathogens upon infection. **Frontiers In Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-26, 2017.

ELLIS, M.; EGELUND, J.; SCHULTZ, C. J.; BACIC, A. Arabinogalactan-Proteins: Key regulators at the cell surface? **Plant Physiology**, vol. 153, p. 403-419, 2010.

FERREIRA, S. S.; PASSOS, C. P.; MADUREIRA, P.; VILANOVA, M.; COIMBRA, M. A. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 378–396, 2015.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, vol. 197, p. 157-160, 1991.

FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analysis using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v.195, n.1, p.93-96, 1991.

GAL, P.; BARNA, L.; KOCSIS, A.; ZAVODSZKY, P. Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. **Immunobiology**, v. 212, p. 267–277, 2007.

GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 1089–1098, 2004.

GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 68, p. 327–332, 2000.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby Immunology**. 4ed. New York: W. H. Freeman, 2000.

HEHEMANN, J.; BORASTON, A. B.; CZJZEK, M. A sweet new wave: structures and mechanisms of enzymes that digest polysaccharides from marine algae **Structural Biology**, v. 28, p. 77–86, 2014.

HORI, R.; SUGIYAMA, J. A combined FT-IR microscopy and principal component analysis on softwood cell walls. **Carbohydrate Polymers**, vol. 52, n. 4, p. 449–453, 2003.

HU, Y.; YE, X.; YIN, X.; CHEN, S. Sulfation of citrus pectin by pyridine-sulfurtrioxide complex and its anticoagulant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, p. 1162-1167, 2015.

ISAKA, S.; CHO, K.; NAKAZONO, S.; ABU, R.; UENO, M.; KIM, D.; ODA, T. Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 68–75, 2015.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênicas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 41-51, 2001.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5 ed., 2003.

KAČURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVÁ, V.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, vol. 43, n. 2, p. 195-203, 2000.

KIYOHARA, H.; CYONG, J. C.; YAMADA, H. Structure and anticomplementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* kitagawa. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 182, p. 259-275, 1988.

KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Structure of an anticomplementary arabinogalactan from the root of *Angelica acutiloba* kitagawa. **Carbohydrate Research**, v. 193, p. 173-192, 1989.

LAMBRIS, J. D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nature Reviews. Microbiology**, 6, 132, 2008.

LEFSIH, K.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; MICHAUD, P.; AMINABHAVI, T. M.; DAHMOUNE, F.; MADANI, K. Extraction, characterization and gelling behavior enhancement of pectins from the cladodes of *Opuntia ficus-indica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 645–652, 2016.

LENZI, R. M. **Análise química e avaliação da atividade imunomoduladora de frações aquosas obtidas a partir de preparações comerciais de *Uncaria tomentosa* (Willd.)** D.C. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

LINA, L.; PING, Z.; YAQI, C.; SHIFEN, M. High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection for simultaneous determination of monosaccharides and uronic acids. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, vol. 34, n. 10, p. 1371-1374, 2006.

MANTOVANI, M. S.; BELLINI, M. F.; ANGELI, J. P. F.; OLIVEIRA, R. J.; SILVA, A. F.; RIBEIRO, L. R. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, v. 658, p. 154–161, 2008.

MELIS, J. P. M., STRUMANE, K., RUULS, S. R., BEURSKENS, F. J., SCHUURMAN, J., PARREN, P. W. H. I. Complement in therapy and disease regulating the complement system with antibody-based therapeutics. **Molecular Immunology**, 67, 117-130, 2015.

MICHAELSEN, T. E.; GILJE, A.; SAMUELSEN, A. B.; HØGÅSEN, K.; PAULSEN, B. S. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 52, p.483-490, 2000.

MIKHAILENKO, M. A.; SHAKHTSHNEIDER, T. P.; ELTSOV, I. V.; KOZLOV, A. S.; KUZNETSOVA, S. A.; KARACHAROV, A. A. BOLDYREV, V. V. Supramolecular architecture of betulin diacetate complexes with arabinogalactan from *Larix sibirica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 1–7, 2016.

MATSUHIRO, B.; LILLO, L. E.; SÁENZ, C.; URZÚA, C. C.; ZÁRATE, O. Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus indica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 263–267, 2006.

MOLLNES, T. E., JOKIRANTA, S., TRUEDSSON, L., NILSSON, B., RODRIGUEZ DE CORDOBA, S., KIRSCHFINK, M. Complement analysis in the 21st century, **Molecular Immunology**, 44, 3838–3849, 2007.

NHARINGO, T.; MOYO, M. Application of *Opuntia ficus-indica* in bioremediation of wastewaters. A critical review. **Journal of Environmental Management**, v. 166, p. 55-72, 2016.

NOTARARIGO, S.; DE LAS CASAS-ENGEL, M.; DE PALENCIA, P. F.; CORBÍ, A. L.; LÓPEZ, P. Immunomodulation of human macrophages and myeloid cells by 2-substituted (1–3)-d-glucan from *P. parvulus* 2.6. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 109–113, 2014.

ODENTHAL, K. P.; SCHWARZ, T.; WITTHOHN, K.; LOOS, M. **Bioassay-guided identification of immunomodulating constituents in Echinacin®**. Zürich: International Congress and 48th Annual Meeting of the society for Medicinal Plant Research, p.4B/16, 2000.

PAULSEN, B. S.; Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. **Current Organic Chemistry**, v. 5, p. 939-950, 2001.

PEÑA-VALDIVIA, C. B.; TREJO, C.; ARROYO-PEÑA, V. B.; SÁNCHEZ-URDANETA, A. B.; BALOISMORALES, R. Diversity of unavailable polysaccharides and dietary fiber in domesticated nopalito and cactus pear fruit (*Opuntia spp.*). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 1599–1610, 2012.

PROVIN, L. **Extração, caracterização química e propriedades reológicas de pectinas da casca de *caryocar brasiliense cambess* (pequi)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

QU, H.; RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. **Molecular Immunology**, v.47, p.185-195, 2009.

ROMÁN, Y.; OLIVEIRA, H. P.; IACOMINI, M. B.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 731-739, 2017.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement-targeted therapeutics. **Nature Biotechnology**, v.25, p.1265–1275, 2007.

RUMYANTSEVA, N. Y. Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis. **Biochemistry**, v.70, n.10, p.1073-1085, 2005.

SANTA, H. S. D. **Efeitos do metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agarius brasiliensis* produzido por cultivo em estado sólido**. 192 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SAMUELSEN, A. B.; WESTERENG, B.; YOUSIF, O.; HOLTEKJØLEN, A. K.; MICHAELSEN, T. E.; KNUTSEN, S.H. Structural features and complement-fixing activity of pectin from three *Brassica oleracea* varieties: white cabbage, kale, and red kale. **Biomacromolecules**, v.8, n.2, p.644-649, 2007.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317-333, 2006.

SEMEDO, A. C. J. **Compostos bioativos de *Opuntia ficus indica***. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos, Universidade de Lisboa Faculdade de Farmácia, Lisboa, 2012.

SEPÚLVEDA, E. SÁENZ, C.; ALIAGA, E.; ACEITUNO, C. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia spp.* **Journal of Arid Environments**, v. 68, p. 534–545, 2007.

SKATTUM, L.; VAN DEUREN, M.; VAN DER POLL, T.; TRUEDSSON, L. Complement deficiency states and associated infections. **Molecular Immunology**, v.48, p. 1643–1655, 2011.

SEYFRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.; BOVO, F., STEVAN-HANCKE, F. R.; MAURER, J. B. B.; ZAWADZKIBAGGIO, S. F. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.1, p.201-214, 2015.

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, p. 1383-1389, 1972.

THIEL, S.; VORUP-JENSEN, T.; STOVER, C.M.; SCHWAEBLE, W.; LAURSEN, S.B.; POULSEN, K.K.; WILLIS, A. C.; EGGLETON, P.; HANSEN, S.; HOLMSKOV, U.; REID, K. B.; JENSENIUS, J. C. A second serine protease-associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v. 386, p. 506-10, 1997.

VAN HOLST, G. J.; CLARKE, A. E. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. **Analytical Biochemistry**, v. 148, n. 2, p. 446-50, 1985.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. Rio de Janeiro: Ed. Campus. p.141-156, 1991.

VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; OLIVEIRA-PETKOWICZ, C. L. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, vol. 84, n. 4, p. 123001236, 2011.

XU, X.; YAN, H.; TANG, J.; CHEN, J.; ZHANG, X. Polysaccharides in *Lentinus edodes*: Isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, p. 474–487, 2014.

YAMADA, H.; OHTANI, K.; KIYOHARA, H.; CYONG, J.; OTSUKA, Y.; UENO, Y.; ŌMURA, S. Purification and chemical properties of anti-complementary polysaccharide from the leaves of *Artemisia princeps*. **Planta Medica**, v. 51, p. 121-125, 1985(a).

YAMADA, H.; NAGAI, T.; CYONG, J.; OTSUKA, Y.; TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; SHIMADA, K. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v.144, p.101–111, 1985(b).

YAMADA, H.; RA, K.; KIYOHARA, K.; CYONG, J.; OTSUKA, Y. Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 209-226, 1989.

YAMASSAKI, Y. T. **Caracterização química, atividade imunomoduladora e antioxidante de extratos aquosos e hidroalcoólicos da goma de exsudato vegetal de *Anacardium occidentale* L. e de folhas de *Persea americana* Mill.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

YARIV, J.; RAPPORT, M. M.; GRAF, L. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. **Biochemical Journal**, v.85, p.383, 1962.

YARIV, L.; LIS, H.; KATCHALSKI, E. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. **Biochemical Journal**, v.105, p.1-2, 1967.

YU, H.; MUÑOZ, E. M.; EDENS, R. E.; LINHARDT, R. J. Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, p. 168 – 176, 2005.

Anexo 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1128

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.215421/2017-11

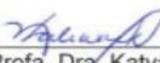
APROVADO/APPROVAL: 12/12/2017 – R.O. 11/2017

TÍTULO: Arabinogalactana-proteínas e pectinas de plantas medicinais: caracterização estrutural e investigação de propriedades imunomoduladoras.

TITLE: Arabinogalactan-proteins and pectins from medicinal plants: structural characterization and investigation of immunomodulatory properties.

AUTORES/AUTHORS: Juliana Bello Baron Maurer, Marcelo B. Molento, Douglas Luís Vieira, João Carlos Minozzo, Selma Faria Zawadzki-Baggio, Raquely Moreira Lenzi, Pamela Fontana, Hayanna Karla Felipe Santos, Monique Adriani Garcia da Silva.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Bioquímica e Biologia Molecular


Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA

Anexo 2

Ministério da
EducaçãoEMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES
COMPLEXO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR

Curitiba, 01 de setembro de 2016.

Ilmo (a) Sr. (a)
Juliana Bello Baron Maurer
Universidade Federal do Paraná
Neste

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que a **Solicitação para alterações na equipe de pesquisa; inserção de novas espécies vegetais a serem estudadas; atualização e inserção de novas metodologias e atualização do cronograma**, datado de 31 de maio de 2016, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado: **“ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS E PECTINAS DE PLANTAS MEDICINAIS: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E INVESTIGAÇÃO DE PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS”**, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em 23 de agosto de 2016.

O referido documento atende aos aspectos das Resoluções CNS 466/2012, e sua complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0187.0.208.000-08
CEP: 1739.156/2008-08

Atenciosamente,

Renato Tambara FilhoVice Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR