



Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo químico da alga *Lithothamnion calcareum* e avaliação da atividade
inibitória do rolamento de leucócitos**

Belo Horizonte, MG
Faculdade de Farmácia da UFMG

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CRISTIANE MOTA SOARES

Estudo químico da alga *Lithothamnion calcareum* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Fernão Castro Braga

Colaboradores: Prof. Mauro Teixeira,

Departamento de Bioquímica, ICB, UFMG

Prof^a Vanessa Pinho da Silva

Departamento de Morfologia, ICB, UFMG

Belo Horizonte, MG

Faculdade de Farmácia da UFMG

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo coração a todas as pessoas que participaram de forma direta ou indireta desse trabalho. Aos amigos de todos os momentos, Anderson e Izabella, que juntos caminhamos nesse percurso tão semelhante dividindo aflições e multiplicando alegrias.

Aos amigos da Fito que tanto contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional no trabalho diário e companheiro que sempre cresceu lá.

Agradecimentos especiais ao professor Fernão, um exemplo de ótimo ser humano sempre disposto a contribuir, trazendo a luz nos momentos de desespero e buscando sempre a melhor saída. Uma pessoa maravilhosa que tive o enorme prazer de trabalhar, que me ensinou muito mais que fitoquímica. A Patrícia, amiga de todas horas, pelo apoio e companheirismo. A Lilica pelos conselhos e momentos de grande descontração. Ao grande Celinho, que sempre ajudando a todos foi essencial nesse trabalho. Ao Milton, Ana Bárbara, Raquel, professora Rachel, Fabíola, Ritinha, Soninha pela amizade. A Priscilla, minha companheira de bancada que gosto tanto, pelas ajudas na química orgânica e amizade tão valiosa. Ao Tálisson pela ajuda e entusiasmo imprescindível nesse trabalho.

Ao Gilson, pelo amor e amizade. A minha mãe e Andréia pelo apoio. A Beatriz, pela grande amizade.

Ao professor Ricardo pelas ajudas nos mecanismos químicos e por disponibilizar o aparelho de infravermelho. Ao professor Mauro, professora Vanessa e Gustavo Menezes pelos ensaios biológicos e a toda sua equipe do ICB.

A todos o meu sincero muito obrigada!

RESUMO

Lithothamnion calcareum (Hapalidaceae) é uma alga marinha encontrada em águas profundas, comercializada no Brasil e no exterior como suplemento nutricional de cálcio e outros minerais. A ocorrência de polissacarídeos em espécies de algas marinhas já foi anteriormente relatada e diversos efeitos biológicos foram descritos para substâncias dessa classe, incluindo atividade antiinflamatória, o que motivou o presente estudo. O material vegetal foi obtido de fonte comercial (Phoster Algemar, Belo Horizonte, Brasil). Inicialmente foram avaliadas diferentes condições extrativas para a obtenção de polissacarídeos de *L. calcareum*, incluindo extração em meio aquoso à temperatura ambiente e a quente (40, 60, 70, 80 e 100 °C), bem como extração em meio básico com solução aquosa de Na₂CO₃ a 1% e 2 % m/v, a quente (60 °C). O percentual de extrativos variou de 0,008 a 0,050%, sendo maior em meio básico (Na₂CO₃ a 2 % m/v, 60 °C). Na seqüência, os extratos foram submetidos à precipitação com solução de etanol / água (4:1), visando obter frações enriquecidas em polissacarídeos, as quais foram dialisadas em membrana de celulose (*cut off* 10.000 Da). Os polissacarídeos foram isolados por cromatografia em colunas de exclusão por tamanho (Sephadex G100 e G25) e troca iônica (Sephacrose Fast Flow), sendo o monitoramento das frações realizado após reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico, em placas de microtitulação. Foram isolados 4 polissacarídeos, cuja composição química foi caracterizada pela quantificação dos teores de sulfato, realizada por turbidimetria, e de ácido urônico, proteínas e açúcares totais, determinados por métodos colorimétricos. A massa molecular dos polissacarídeos isolados foi estimada por filtração molecular em cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho (HPSEC), a partir da comparação com padrões de pululanas, de diferentes massas moleculares. Os polissacarídeos obtidos apresentaram massas moleculares na faixa de 38 ± 2 a 270 ± 20 KDa, com teores de ácido urônico entre 1,7 ± 0,1 e 9,0 ± 1,0 %. O teor de proteínas variou de 3,0 ± 1,0 a 32,0 ± 1,0% e a porcentagem de açúcares totais de 6,0 ± 1,0 a 51,0 ± 2,0%. Já a concentração de sulfato atingiu 37 ± 5% em alguns polissacarídeos e teve como valor mínimo 3 ± 3%. A natureza polissacarídica das substâncias isoladas foi confirmada por análises espectroscópicas no infravermelho. A potencial atividade antiinflamatória da fração enriquecida em polissacarídeos e das substâncias isoladas foi avaliada *in vivo* em modelo de inibição de rolamento de leucócitos, através de microscopia intravital de vênulas do músculo cremáster de camundongos. Salina e fucoidina foram utilizadas, respectivamente, como controles negativo e positivo. Os polissacarídeos sulfatados B1P 1-19 e B1P 22-37 inibiram o rolamento de leucócitos em aproximadamente 90% após administração por via intravenosa (100 mg/mL), atividade comparável ao controle positivo, administrado na dose de 10 mg/Kg. A análise da composição química e atividade biológica dos polissacarídeos isolados indica que alto grau de sulfatação e massa molecular elevada favorecem a atividade inibitória do rolamento de leucócitos. O isolamento de polissacarídeos de *L. calcareum*, sua caracterização química e avaliação da potencial atividade antiinflamatória é descrita pela primeira vez no presente trabalho.

Palavras-chave: *Lithothamnion calcareum*; alga marinha; polissacarídeos sulfatados; caracterização química; inibição do rolamento de leucócitos.

ABSTRACT

Lithothamnion calcareum (Hapaladiceae) is a marine alga found in deep waters, commercialized in Brazil and abroad as food supplement of calcium and other minerals. Polysaccharides have been reported as constituents of marine algae, possessing several biological activities, including anti-inflammatory effect. The species was obtained from a commercial source (Phoster Algemar, Belo Horizonte, Brazil). Different conditions for polysaccharide extraction were evaluated, including aqueous medium under heating (40, 60, 70, 80 and 100°C) and alkaline extraction with 1% and 2% w/v Na₂CO₃ solution, at 60 °C. Ethanol was added to the extracts (4:1) for polysaccharide precipitation, following dialysation (cut off 10,000 Da) and extract concentration. Extractives ranged from 0.008 to 0.050%, being the highest yield found for alkaline extraction (2% w/v Na₂CO₃, 60 °C). The polysaccharide mixture was fractionated by size exclusion chromatography (Sephadex G-100 and G-25) and ion exchange chromatography (Sephacrose Fast Flow). The obtained compounds were characterized by UV and IR spectrometry, in addition to colorimetric reaction with phenol-sulphuric acid. Four polysaccharides were isolated and had their chemical composition characterized by quantification of sulfate content, carried out by turbidimetry, along with uronic acid, proteins and total sugar contents, determined by colorimetric methods. The molecular weight (MW) was estimated by high performance size exclusion chromatography (HPSEC), by comparison with pullulan standards of different MW. The polysaccharides presented MW in the range 38 ± 2 to 270 ± 20 KDa and uronic acid contents from 1.7 ± 0.1 to 9.0 ± 1.0 %. The protein proportion varied from 3.0 ± 1.0 to 32.0 ± 1.0%, whereas total sugar content was found between 6.0 ± 1.0 and 51.0 ± 2.0%. On its turn, sulfate contents reached up to 37 ± 5% in some polysaccharides and showed minimum value of 3 ± 3%. The anti-inflammatory activity was assayed in mice, using a model of leukocyte rolling inhibition (*n*=3) employing intravital microscopy. Fucoidin and saline were employed as positive and negative controls, respectively. The intravenous injection of sulfated polysaccharides B1P 1-19 (100 mg/Kg) and B1P 22-37 (100 mg/Kg) in mice reduced leukocyte rolling by approximately 90%, whereas fucoidin (10 mg/Kg) induced a similar response. Analysis of chemical composition and biological activity induced by the polysaccharides indicate that high level of sulfatation and high MW favour inhibition of leukocyte rolling. The isolation and chemical characterization of polysaccharides from *L. calcareum* and the evaluation of their potential anti-inflammatory activity are here reported for the first time.

Key-words: *Lithothamnion calcareum*; marine alga; sulfated polysaccharides; chemical characterization; leukocyte rolling inhibition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de eluição utilizado para obtenção dos perfis cromatográficos por RP-HPLC.....	41
Tabela 2: Padrões de pululana (P-82) utilizados na determinação das massas moleculares dos polissacarídeos de <i>L. calcareum</i>	48
Tabela 3: Fracionamento de B1P em coluna de Sephadex G-100.	50
Tabela 4: Fracionamento de B2P em coluna de Sephadex G-100.	50
Tabela 5: Efeito da temperatura na extração de polissacarídeos de <i>L. calcareum</i>	53
Tabela 6: Efeito da concentração da solução aquosa de Na ₂ CO ₃ na extração de polissacarídeos de <i>L. calcareum</i>	54
Tabela 7: Teores percentuais de açúcares totais em frações polissacarídicas de <i>L. calcareum</i>	64
Tabela 8: Teor médio de sulfato nas frações de polissacarídeos de <i>L. calcareum</i>	66
Tabela 9: Teor de ácido urônico nas frações de polissacarídeos de <i>L. calcareum</i>	69
Tabela 10: Teor de proteínas nas frações de polissacarídeos de <i>L. calcareum</i>	71
Tabela 11: Caracterização química da fração FP	75
Tabela 12: Caracterização estrutural dos polissacarídeos oriundos do fracionamento de B1P.	83
Tabela 13: Caracterização estrutural dos polissacarídeos oriundos do fracionamento de B2P	88
Tabela 14: Caracterização estrutural dos polissacarídeos oriundos do fracionamento de B1P, B2P e FP da alga <i>L. calcareum</i>	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alga marinha <i>Lithothamnion calcareum</i>	19
Figura 2: Eicosanóides isolados de extrato de mistura de <i>Lithothamnion calcareum</i> e <i>Lithothamnion corallioides</i>	21
Figura 3: Cascata de adesão entre leucócitos e células endoteliais durante o processo de migração celular, com destaque para as moléculas de adesão (selectinas) (adaptado de DÍAZ-GONZALES & SÁNCHEZ-MADRID, 1998).....	29
Figura 4: Esquema de representação das selectinas e seus ligantes naturais (adaptado de MCEVER et al, 1997).....	30
Figura 5: Fluxograma dos processos de extração, isolamento e purificação de polissacarídeos constituintes da alga <i>L. calcareum</i>	55
Figura 6: Cromatograma obtido por RP-HPLC para a fração B1P, oriunda da extração da alga <i>L. calcareum</i> em meio básico e precipitação dos polissacarídeos em solução hidroalcoólica. Na parte superior da figura estão representados os espectro no UV registrados <i>on line</i> pelo detector de DAD para os picos principais. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 4.1.7.2.	56
Figura 7: Cromatograma da fração B1P em coluna de C18 e eluição em gradiente de água e acetonitrila (5 a 10% do modificador orgânico em 45 min). Na parte superior da figura estão representados os espectro no UV registrados <i>on line</i> pelo detector de DAD para os picos principais.	57
Figura 8: Cromatogramas obtidos por HPSEC-UV para as frações FP, QP, B1P e B2P. Condições cromatográficas: coluna Ultrahydrogel Linear com eluição isocrática de água MiliQ, fluxo de 0,6mL/min, à temperatura ambiente e detecção no UV _{210nm} . No cromatograma de FP apresenta-se o espectro no UV registrado <i>on-line</i> para o pico majoritário destacado e seu tempo de retenção. FP: extração a temperatura ambiente, QP: a quente, B1P: em meio básico (1% Na ₂ CO ₃) e B2P em meio básico (2% Na ₂ CO ₃).....	58

Figura 9: Proposta de mecanismo químico da reação colorimétrica de fenol- ácido sulfúrico para pentoses (xilose).....	60
Figura 10: Proposta de mecanismo da reação fenol-ácido sulfúrico para hexoses (galactose).....	60
Figura 11: Espectro no UV/VIS obtido para a fração B1P (0,33 g/L), após reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico.....	61
Figura 12: Espectro no infravermelho da fração FP.....	62
Figura 13: Espectro no infravermelho da fração QP.....	62
Figura 14: Espectro no infravermelho da fração B1P.	63
Figura 15: Espectro no infravermelho da fração B2P.	63
Figura 16: Curva de calibração empregada para a quantificação de açúcares totais, obtida pela reação colorimétrica de fenol-ácido sulfúrico com galactose.	64
Figura 17: Fundamento químico da reação de quantificação de sulfato em polissacarídeos por turbidimetria.....	65
Figura 18: Curva de calibração para quantificação de sulfato pelo método turbidimétrico (DODGSON e PRICE, 1962).....	66
Figura 19: Proposta de mecanismo para a reação de quantificação de ácido urônico pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).....	68
Figura 20: Curva de calibração para quantificação de ácido urônico pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita, empregando ácido glicurônico como substância de referência.....	69
Figura 21: Curva de calibração para quantificação espectrofotométrica de proteínas totais pelo método de Brandford, empregando-se albumina sérica bovina como substância de referência e detecção em 595 nm.	71
Figura 22: Curva de calibração obtida a partir da análise de padrões de pululanas de massas moleculares distintas por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho (HPSEC) (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.8.7).....	72

Figura 23: Cromatograma do fracionamento de FP em coluna de Sepharose Fast Flow com eluição em gradiente de NaCl e detecção em 490 nm, após reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.1.....	74
Figura 24: Cromatograma do fracionamento de FP em coluna de Sephadex G-25, com eluição isocrática de água destilada e detecção em 490 nm, após reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.1.	75
Figura 25: Primeiro fracionamento de B1P por filtração molecular em coluna de Sephadex G-100 e eluição com água destilada. Detecção no visível em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.2.....	76
Figura 26: Fracionamento de B1P 20-31 por cromatografia de troca iônica em coluna de Sepharose Fast Flow e eluição com soluções de NaCl. Detecção em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.2.	77
Figura 27: Segundo fracionamento de B1P por filtração molecular em coluna de Sephadex G-100 e eluição com água destilada. Detecção no visível em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.2.....	77
Figura 28: Cromatogramas obtidos por HPSEC-UV para B1P e para as frações oriundas deste (B1P 1-19, B1P 20-31, B1P 20-31FF, B1P14-21 e B1P 22-37). Condições cromatográficas: coluna Ultrahydrogel Linear com eluição isocrática de água MiliQ, fluxo de 0,6mL/min, temperatura ambiente e detecção no UV em 210nm. Apresentam-se, também, os espectros no UV registrados <i>on-line</i> para os picos destacados e seus respectivos tempos de retenção(TR).....	79
Figura 29: Espectro de infravermelho da fração B1P 1-19.....	81
Figura 30: Espectro de infravermelho da fração B1P 20-31 FF.....	81
Figura 31: Espectro de infravermelho da fração B1P 1-13.....	82
Figura 32: Espectro de infravermelho da fração B1P 14-21.....	82
Figura 33: Espectro de infravermelho da fração B1P 22-37.....	82

Figura 34: Fracionamento de B2P em coluna aberta de Sephadex G-100 e eluição com água destilada. Detecção no visível em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.1.9.3.....	85
Figura 35: Cromatogramas obtidos por HPSEC-UV para B2P e frações oriundas desta (B2P 1-10, B2P 11-23, B2P 24-35). Condições cromatográficas: coluna Ultrahydrogel Linear com eluição isocrática de água MiliQ, fluxo de 0,6mL/min, temperatura ambiente e detecção no UV _{210nm} . Apresentam-se, também, os espectros no UV registrados <i>on-line</i> para os picos destacados e seus respectivos tempos de retenção (Tr).....	86
Figura 36: Espectro no infravermelho da fração B2P 1-10.....	87
Figura 37: Espectro no infravermelho da fração B2P 11-23.....	87
Figura 38: Espectro no infravermelho da fração B2P 24-35.....	87
Figura 39: Redução relativa da porcentagem máxima de rolamento de leucócitos <i>in vivo</i> produzida por fucoidina (controle positivo, 10 mg/mL) e pela fração FP oriunda de <i>L. calcareum</i> . A amostra foi ensaiada na concentração de 10 e 100 mg/Kg. Os dados foram obtidos após 1 e 10 min da injeção.....	91
Figura 40: Redução relativa da porcentagem máxima de rolamento de leucócitos <i>in vivo</i> produzida pelas frações B1P 1-19, B1P 14-21 e B1P 22-37 oriundas de <i>L. calcareum</i> . As amostras foram ensaiadas na concentração de 100 mg/Kg. Salina foi empregada como controle negativo..	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Artrite reumatóide
AU	Ácido urônico
CCD	Cromatografia de camada delgada
GS	Grau de sulfatação
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IV	Infravermelho
HPSEC	Cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência (<i>high performance size exclusion chromatography</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
RID	Detector de índice de refração
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa (<i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>)
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

LISTA DE ESTRUCTURAS QUÍMICAS

- 1 Laurenditerpenol
- 2 Acetato de 7-desoxiparguerol
- 3 Pseudopeterosina E
- 4 Carragenanas
- 5 Agaranas
- 6 Agarose
- 7 Carragenose
- 8 Xilogalactanas sulfatadas
- 9 Ácido algínico
- 10 Fucoidina tipo I
- 11 Fucoidina tipo II
- 12 Tetrassacarídeo Sialyl Lewis^x (sLex^x)
- 13 Heparinas sulfatadas
- 14 Ficarinas sulfatadas / Curdlanas sulfatadas
- 15 Pululanas sulfatadas
- 16 Reagente Coomassie Brilliant Blue G-250
- 17 Pululanas

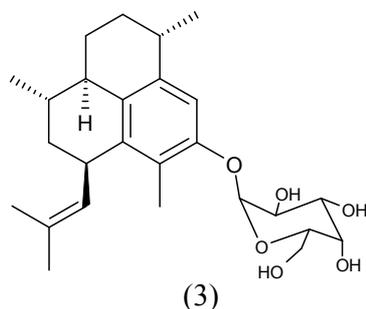
SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS	12
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Algas vermelhas calcárias e a espécie <i>Lithothamnion calcareum</i>	19
3.2 Polissacarídeos sulfatados presentes em algas calcárias	21
3.3 Atividades biológicas de polissacarídeos	25
3.4 Inflamação e moléculas de adesão	27
4 PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1 Materiais e métodos	36
4.1.1 Equipamentos	36
4.1.2 Reagentes	37
4.1.3 Materiais de consumo	37
4.1.4 Material vegetal	38
4.1.5 Obtenção dos extratos brutos	38
4.1.5.1 Extratos orgânicos	38
4.1.5.2 Extrato aquoso à temperatura ambiente (LTF)	39
4.1.5.3 Extrato aquoso a quente (LTQ)	39
4.1.5.4 Extração básica (LTQB)	39
4.1.5.5 Extração ácida	40

4.1.6	Obtenção das frações de polissacarídeos.....	40
4.1.7	Perfis cromatográficos por RP-HPLC e HPSEC.....	41
4.1.7.1	Preparo das amostras	41
4.1.7.2	Condições cromatográficas.....	41
4.1.8	Caracterização estrutural dos polissacarídeos	42
4.1.8.1	Espectroscopia no UV/VIS e reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico.....	42
4.1.8.2	Espectroscopia no infravermelho	42
4.1.8.3	Açúcares totais.....	42
4.1.8.4	Quantificação de sulfato	44
4.1.8.5	Quantificação de ácido urônico	45
4.1.8.6	Quantificação de proteínas	47
4.1.8.7	Determinação da massa molecular	47
4.1.9	Fracionamentos cromatográficos.....	48
4.1.9.1	Fracionamento de FP	49
4.1.9.2	Fracionamento de B1P	49
4.1.9.3	Fracionamento de B2P	50
4.1.10	Ensaio biológico de inibição de rolamento de leucócitos	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Otimização das condições de extração e obtenção de frações polissacarídicas	53
5.2	Análise cromatográfica das frações de polissacarídeos por RP-HPLC e HPSEC....	56
5.3	Caracterização estrutural dos polissacarídeos	59
5.3.1	Espectroscopia no UV/VIS e reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico	59
5.3.2	Espectroscopia no infravermelho	61
5.3.3	Açúcares totais.....	63
5.3.4	Quantificação de sulfato	65

5.3.5	Quantificação de ácido urônico	67
5.3.6	Quantificação de proteínas	70
5.3.7	Determinação da massa molecular	71
5.4	Fracionamento e caracterização estrutural das frações resultantes / polissacarídeos isolados	73
5.4.1	Fracionamento de FP	73
5.4.1.1	Cromatografia em coluna aberta de troca iônica (Sephacose Fast Flow).....	73
5.4.1.2	Cromatografia em coluna aberta de filtração molecular (Sephadex G-25)..	74
5.4.2	Fracionamento de B1P	75
5.4.3	Fracionamento de B2P	84
5.5	Ensaio de inibição do rolamento de leucócitos	90
6	CONCLUSÃO.....	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

“Resilience”, produzido pelo laboratório francês Estee Lauder (NEWMAN & CRAGG, 2004).



Dentre as diversas classes de organismos marinhos atualmente estudados como fontes de novas moléculas bioativas destacam-se espécies de algas, consideradas promissoras para a obtenção de substâncias de interesse farmacológico (BLUNT et al, 2006).

A alga marinha *Lithothamnion calcareum*, selecionada para estudo no presente trabalho, é comercializada no país e no exterior como suplemento nutricional de minerais, principalmente cálcio e magnésio. Apesar do extenso uso da espécie no Brasil e em outros países, o conhecimento sobre sua composição química e atividades biológicas é bastante incipiente. A ocorrência de polissacarídeos sulfatados em outras espécies de algas marinhas (NAVARRO & STORTZ, 2002) e a potencial atividade antiinflamatória de substâncias dessa classe motivaram a seleção de *Lithothamnion calcareum* para estudo químico e de atividade biológica.

2 OBJETIVOS

Realizar o estudo químico da alga vermelha *Lithothamnion calcareum* e avaliar sua potencial atividade antiinflamatória.

2.1 Objetivos específicos

1. Preparar os extratos da alga utilizando solventes de diferentes polaridades
2. Realizar o fracionamento preliminar do extrato bruto visando obter frações enriquecidas em polissacarídeos e/ou em constituintes micromoleculares.
3. Isolar e purificar os constituintes das frações supracitadas.
4. Avaliar a atividade antiinflamatória das substâncias isoladas em modelo *in vivo* de rolamento de leucócitos por microscopia intravital em camundongos.
5. Elucidar a estrutura química, no caso de micromoléculas, ou realizar sua caracterização estrutural, no caso de polissacarídeos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Algas vermelhas calcárias e a espécie *Lithothamnion calcareum*

A espécie *Lithothamnion calcareum* (Figura) é uma alga do filo das Rhodophytas, conhecida como alga vermelha, pertencente à ordem das Corallinales e família Hapalidiaceae, segundo o sistema de classificação taxonômica de algas AlgaeBase (GUIRY & GUIRY, 2009).



Figura 1: Alga marinha *Lithothamnion calcareum*.

As algas calcárias (classe Rhodophyceae, ordem Corallinales) ocorrem na zona entremarés, com profundidade de até 200 metros, na extensão latitudinal da linha do Equador aos pólos (PEREIRA & GOMES, 2002).

Existem atualmente 34 gêneros, descritos para o grupo das algas calcárias, que englobam de 300 a 500 espécies, cuja classificação é dificultada devido à grande similaridade filogenética. Granulados bioclásticos marinhos são constituídos por algas calcárias e fragmentos de conchas e areias, os quais servem de substrato para fixação de algas foliares, como as espécies de *Sagassum sp.* comumente encontradas no litoral brasileiro. *L. calcareum* é um dos principais constituintes dos recifes e corais marinhos, formados em várias regiões oceânicas (DIAS, 2000).

As coralináceas são algas fotossintéticas que dependem da luz. Carbonatos de cálcio e magnésio depositam-se na parede celular dessas algas na forma de cristais de calcita, representando entre 80% a 90% da biomassa. A partir do depósito de sais inorgânicos, a alga

morre e perde a coloração avermelhada característica da película viva superficial da crosta algálica (DIAS, 2000).

Além da composição majoritária de carbonatos, as algas calcárias possuem mais de 20 oligoelementos presentes em quantidades variáveis, principalmente ferro, magnésio, boro, níquel, cobre, zinco, molibdênio, selênio e estrôncio. As algas calcárias apresentam diversas aplicações comerciais, incluindo agricultura (maior volume), potabilização de águas para consumo, indústria de cosméticos, dietética, implantes em cirurgia óssea, nutrição animal e tratamento da água em lagos (DIAS, 2000). O uso na agricultura para correção do pH de solos ácidos é dependente da elevada concentração de carbonatos. A alga também é rica em elementos minerais, principalmente cálcio e magnésio como mencionado anteriormente, e serve para otimizar o balanço físico-químico de solos e favorecer o ambiente para a microbiota, deixando-o mais fértil (DIAS, 2000).

As formas livres (*free-living*) como os rodolitos, nódulos e seus fragmentos são viáveis para exploração comercial, sendo depósitos sedimentares não consolidados que podem ser retirados por dragagem. O crescimento lento das algas calcárias inviabiliza seu cultivo, sendo necessário manter bancos intactos dessas algas para a preservação da espécie (DIAS, 2000).

A França é o principal produtor de granulados calcários para uso industrial, sendo extraídas principalmente as espécies *Lithothamnium calcareum* e *Lithothamnium coralloides*. No Brasil, foi confirmada a ocorrência de depósitos de algas vermelhas calcárias na plataforma continental do Norte e Nordeste na década de 60, e posteriormente no Sudeste (DIAS, 2000).

As algas calcárias são pouco estudadas quanto sua composição em substâncias orgânicas, estando disponíveis apenas dados relativos aos constituintes inorgânicos e aspectos geológicos (DIAS, 2000).

Cápsulas contendo o granulado de *Lithothamnium calcareum* são comercializadas como suplemento alimentar no Brasil e em outros países, sendo recomendadas como fonte de cálcio, com a finalidade principal de prevenção da osteoporose. Inúmeras outras indicações são listadas para os produtos, tais como energético e úteis na redução de peso e celulite, além de diminuição de sintomas e sinais relacionados à artrite reumatóide, caso do produto comercializado com o nome de Vitalidade +50[®] (Phoster Algamar, Belo Horizonte, Brasil). Essas indicações não apresentam fundamentação científica e o levantamento bibliográfico realizado indicou carência de dados sobre a composição química e atividades biológicas de *L. calcareum*.

A composição química da espécie é praticamente desconhecida, estando restrita ao isolamento de eicosanóides (Figura 2) do extrato etanólico de uma mistura das espécies *Lithothamnion corallioides* e *L. calcareum* (GUERRIERO et al, 2004). Por outro lado, produtos naturais de diversas classes já foram isolados de algas da ordem Corallinales, incluindo polissacarídeos sulfatados (BILAN & USOV, 2001 e NAVARRO & STORTZ, 2002).

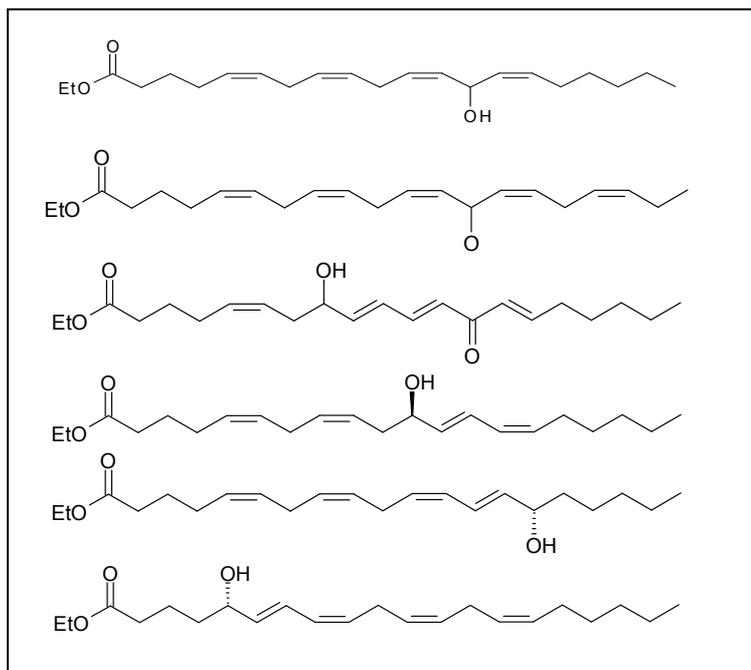


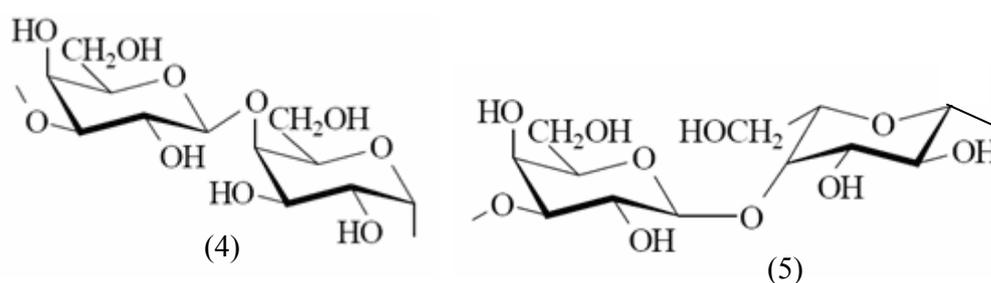
Figura 2: Eicosanóides isolados de extrato de mistura de *Lithothamnion calcareum* e *Lithothamnion corallioides*.

3.2 Polissacarídeos sulfatados presentes em algas calcárias

A matriz da parede celular das algas vermelhas é constituída principalmente por galactanas sulfatadas, ou seja, polissacarídeos que possuem a galactose como monossacarídeo majoritário na cadeia principal (BILAN & USOV, 2001). Os polissacarídeos são polímeros de elevada massa molecular resultantes de reações entre cetoses e/ou aldoses formando ligações osídicas entre a hidroxila hemiacetálica em C-1 com qualquer uma das hidroxilas do açúcar vizinho, liberando uma molécula de água (POSER, 2007).

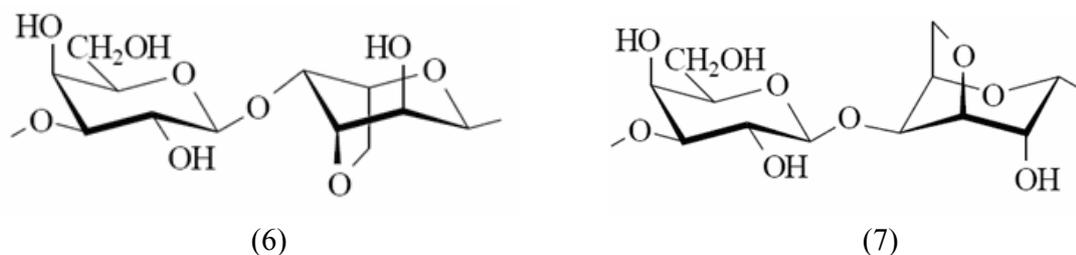
Polissacarídeos do tipo homogalactanas, polímeros formados quase exclusivamente por galactose, assim como heterogalactanas, constituídas por monossacarídeos variados (xilose, glicose, arabinose e manose), têm elevada ocorrência no filo das Rhodophytas (LAHAYE, 2001).

Galactanas isoladas de algas vermelhas normalmente apresentam cadeia linear composta por resíduos de β -galactose ligados em C-3, alternados com resíduos de α -galactose ligados em C-4. Os resíduos de β -galactose pertencem à série D, já os resíduos de α -galactose podem apresentar as configurações D e L. A classificação das galactanas como carragenanas (4) ou agaranas (5) é determinada pelas configurações D e L, respectivamente.



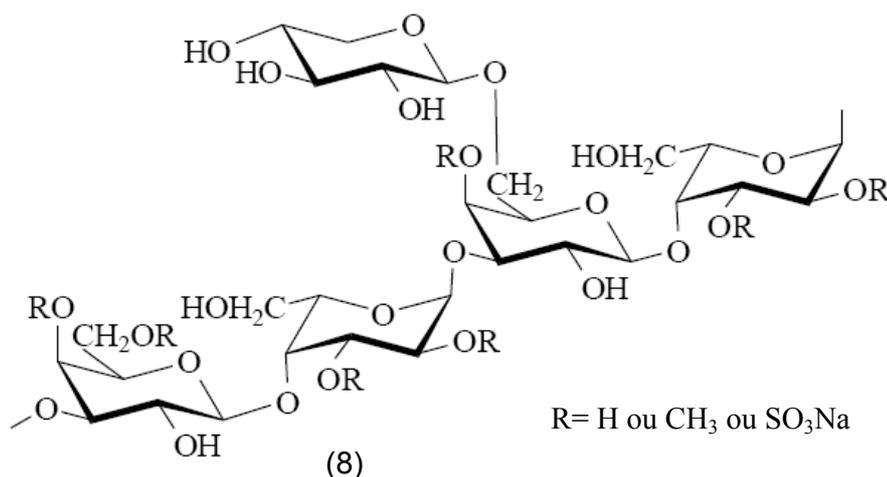
As agaranas de característica ácida obtidas das algas Rhodophytas dos gêneros *Gelidium*, *Gracilaria*, *Gelidiella* e *Pterocladia* são usadas principalmente como constituintes de meios de cultura de microorganismos, sendo também empregadas como agentes desintegrantes em comprimidos e, ainda, como laxante. Já as carragenanas extraídas de espécies de *Chondrus* e *Gigartina* são empregadas como agentes espessantes, gelificantes e estabilizantes pelas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (POSER, 2007).

Resíduos de 3,6-anidrogactose também são encontrados em algas vermelhas formando a agarose (6) e carragenose (7); porém, esses derivados não ocorrem em algas vermelhas da ordem Corallinales (BILAN & USOV, 2001).



A grande variedade de monossacarídeos e a possibilidade de derivações pela substituição da hidroxila por outros grupos funcionais, como sulfato, metoxila e ácido pirúvico, geram diferenças nas propriedades dos polímeros. Assim, o alto poder de gelificação apresentado pela agarose e algumas carragenanas não é relatado para todas as galactanas (LAHAYE, 2001).

Os polissacarídeos constituintes de algas vermelhas da ordem Corallinales são bastante distintos daqueles encontrados em plantas e algas, sendo usualmente constituídos por polímeros de xilogalactanas sulfatadas (8). Nessas substâncias, a cadeia principal composta por galactose possui resíduos de xilose ligados em determinadas posições, além da presença de grupos sulfatos (BILAN & USOV, 2001).



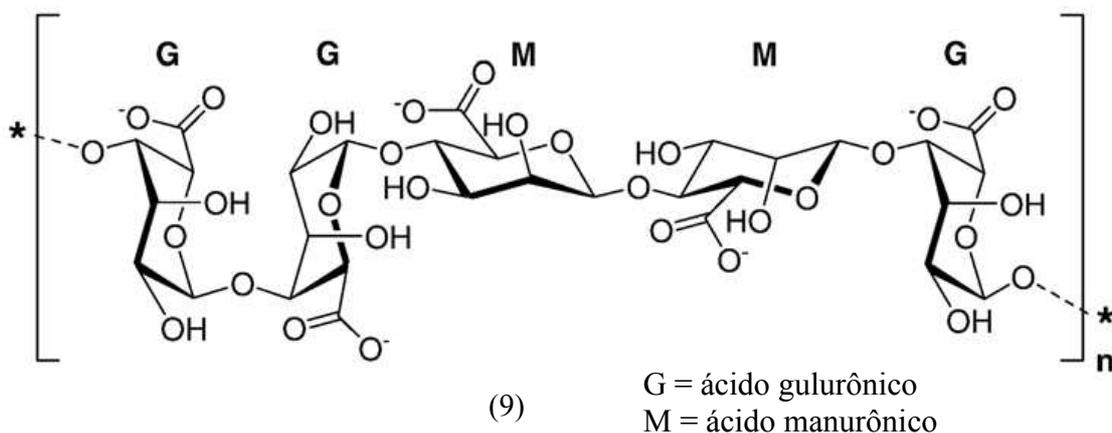
Os polissacarídeos constituintes de espécies de Corallinales são pouco estudados devido ao baixo rendimento, resultante do elevado teor calcáreo. O primeiro polissacarídeo isolado de alga calcária foi o estudado por Turvey e Simpson em meados da década de 70. Nesse trabalho foi isolada uma xilogalactana sulfatada denominada coralinana, da espécie atlântica *Corallina officinalis*, contendo 61,5% de galactose (D/L na taxa de 1:1), 22,7% de xilose e 9,3% de sulfato. A alta porcentagem de xilose e a ausência do resíduo de 3,6-anidrogactose demonstraram composição química distinta das galactanas já relatadas para as algas Rhodophytas (BILAN & USOV, 2001).

Posteriormente demonstrou-se que a xilogalactana sulfatada isolada da alga *C. officinalis* é uma agarana com resíduos de xilose na posição C-6 do resíduo de galactose ligado em C-3. Grupos sulfato também se ligam nesse sítio, além de ocorrerem nas posições C-2 e C-3 do

resíduo de galactose ligado em C-4. Em menor proporção foi descrita a ocorrência de coralinanas contendo grupos metoxila nas posições C-2, C-3 e C-6 (BILAN & USOV, 2001).

Xilogalactanas sulfatadas, idênticas a descrita, também foram isoladas das espécies *Corallina pilulifera*, *Bossiella cretacea* e *Clathromorphum nereostratum* encontradas no Oceano Pacífico, pertencentes à mesma ordem da alga *L. calcareum* (Corallinales). O polissacarídeo isolado de *C. pilulifera* é constituído por D-galactose, L-galactose, 2-O-metil-L-galactose, 3-O-metil-L-galactose, 6-O-metil-D-galactose, D-xilose e sulfato na proporção molar de 29:20:5:2:1:20:23 (USOV et al, 1997; BILAN & USOV, 2001). A xilogalactana isolada de *Joculator maximus*, também pertencente às Corallinales, apresenta apenas um derivado metilado na posição C-2. Esses dados indicam que xilogalactanas constituem marcadores químicos de algas da ordem Corallinales (BILAN & USOV, 2001).

Também já foi relatada, na família Corallinaceae, a presença de polímeros do ácido algínico (9), formados por ligações entre os ácidos manurônico e gulurônico em diversas proporções molares. O ácido algínico foi isolado da espécie *Seraticardia maxima*, porém é encontrado principalmente em algas pardas (filo das Phaeophytas) e em algumas bactérias. Assim, as algas calcárias diferem das outras algas do mesmo filo por sintetizar xilogalactanas sulfatadas e polímeros do ácido algínico, incomuns às Rhodophytas de uma forma geral (BILAN & USOV, 2001).



As funções de sustentação e de reserva energética são amplamente atribuídas aos polissacarídeos, tanto em plantas terrestres como em algas marinhas. Nas algas calcárias, a precipitação dos cristais de calcita é orientada pelas cadeias dos polissacarídeos, que funcionam como matrizes para o processo de calcificação. A participação de polímeros do ácido algínico nesse processo foi sugerida, devido sua capacidade de interagir com íons cálcio (BILAN & USOV, 2001).

3.3 Atividades biológicas de polissacarídeos

Diversas atividades biológicas já foram descritas para polissacarídeos de algas incluindo antioxidante, antiviral, antitumoral e anticoagulante (MAYER & LEHMANN, 2001; MAYER & HAMANN, 2004; SMIT, 2004).

Conforme mencionado anteriormente, a diversidade estrutural dos polissacarídeos sulfatados deve-se a variações nas posições de ligação entre os monossacarídeos e à distribuição dos grupos sulfato. Portanto, a variedade de polissacarídeos é grande, podendo-se observar atividades biológicas específicas para cada polímero (BERTEAU & MULLOY, 2003).

A atividade antioxidante de diversos polissacarídeos já foi amplamente relatada. Polissacarídeos sulfatados obtidos de algas pardas (QI et al, 2005) e da alga vermelha *Porphyra haitanesis* apresentaram atividade antioxidante em modelo *in vitro* de sequestro de radicais superóxido e hidroxila (ZHANG et al, 2003). De maneira semelhante, polissacarídeos isolados do fungo marinho filamentosso *Keissleriella sp.* apresentam significativa atividade antioxidante *in vitro*, além de inibir *in vivo* mediadores da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SUN et al, 2004).

A potencial atividade anti-artrite de polissacarídeos sulfatados também foi relatada. Em estudo realizado com polissacarídeo constituinte do cogumelo *Gadema lucidum* demonstrou-se a proteção *in vivo* e *in vitro* de macrófagos expostos ao hidroperóxido de *t*-butila, quando avaliado nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, administradas por via intraperitoneal em camundongos, durante 5 dias. A atividade protetora de injúrias teciduais, relacionada a espécies reativas, foi demonstrada a partir de análises morfológicas (microscopia eletrônica) e da taxa de sobrevivência dos macrófagos (LIN & CAO, 2002). Um polissacarídeo peptídico obtidos do mesmo cogumelo, utilizado na Medicina Tradicional Chinesa para melhoria dos sintomas associados à artrite reumatóide (AR), além de outras indicações, foi avaliado quanto à atividade inibitória de liberação de citocinas e proliferação de fibroblastos em modelos *in vitro*. Esse polissacarídeo é constituído por mais de 16 aminoácidos e diversos açúcares, predominando a glicose, conectados por ligações β -glicosídicas, com massa molecular de $5,13 \times 10^5$ Da. As concentrações ensaiadas do polissacarídeo foram de 50, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Observou-se discreta diminuição da proliferação de fibroblastos isolados do líquido sinovial de pacientes com AR, além de diminuição da liberação de IL-8 e MCP-1, quando as células foram ativadas com LPS ou IL-1 β , na maior concentração ensaiada. A diminuição da expressão de RNAm p50 pelos fibroblastos ativados indicam que o mecanismo de ação se dê pela inibição transcricional das citocinas via NF-kB (HO et. al., 2007).

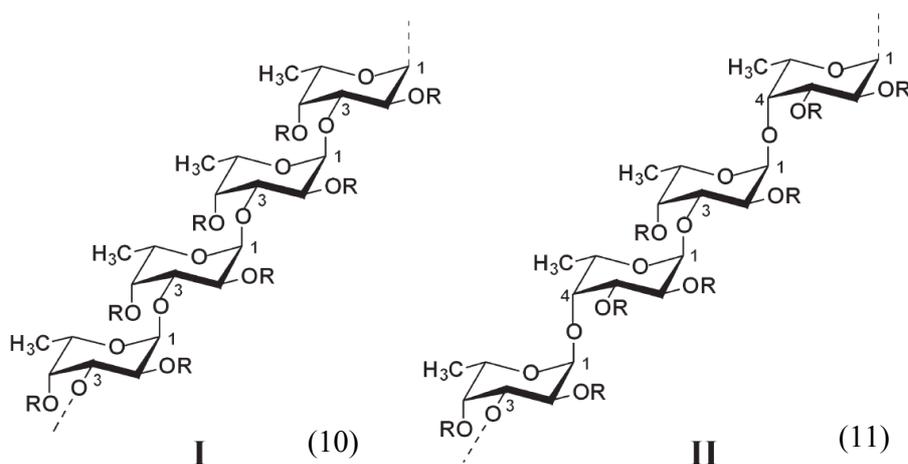
As fucanas sulfatadas, polissacarídeos de fucose extraídos principalmente de algas pardas do filo Phaeophytas, vem sendo estudadas desde a década de 90 quanto a possíveis atividades biológicas. As atividades anticancerígena e antiviral já foram demonstradas para substâncias dessa classe (CUMASHI et al, 2007), assim como ação anti-tromboembólica e anticoagulante, similar à da heparina (POSER, 2007).

Cabe ressaltar que a atividade antiinflamatória das fucanas sulfatadas, a partir da redução do rolamento de leucócitos e conseqüente migração celular para o sítio inflamatório, faz-se via inibição de interação célula-célula mediada pelas selectinas (BERTEAU & MULLOY, 2003).

Fucanas isoladas de *L. saccharina* e *F. evanescens*, entre outras espécies de algas pardas, promoveram a redução do extravasamento de leucócitos polimorfos nucleares em processo inflamatório agudo (CUMASHI et al, 2007). Esse efeito antiinflamatório foi demonstrado pela diminuição das citocinas IL-1 e TNF- α em fluido cérebro-espinhal de coelhos infectados com *Streptococcus pneumoniae* (OSTERGAARD et al, 2000).

É evidente que as atividades relatadas dependem das estruturas químicas e arranjos espaciais, assim como da massa molecular e posição dos grupos substituintes, sendo, portanto, necessária a caracterização estrutural dos polissacarídeos para estabelecer relações com a atividade biológica relatada.

As fucanas sulfatadas mais comumente isoladas possuem dois tipos estruturais de cadeias principais. A estrutura **tipo I** (10) é caracterizada pela repetição da ligação glicosídica 1-3 entre os resíduos de α -D-fucopiranoses; já na estrutura do **tipo II** (11) prevalece a alternância entre as ligações 1-3 e 1-4. Este arcabouço estrutural pode incluir outros carboidratos e derivados como substituintes, incluindo ácido glicurônico, galactose, xilose e grupos sulfato (CUMASHI et al, 2007).



As atividades biológicas relatadas para fucanas sugerem o potencial dessas moléculas para o desenvolvimento de fármacos. Porém, a gama de efeitos biológicos apresentados indica baixa seletividade. Assim, outros polissacarídeos isolados de espécies marinhas podem possuir ações mais seletivas, envolvendo majoritariamente um alvo biológico, apresentando maior relevância para o desenvolvimento de fármacos que as fucanas sulfatadas.

3.4 Inflamação e moléculas de adesão

A inflamação é definida como a resposta dos tecidos vascularizados a estímulos de várias etiologias, correspondendo a um mecanismo de defesa que envolve também o processo de reparo tecidual. Os sinais e sintomas da inflamação decorrem de alterações microscópicas que ocorrem principalmente na microcirculação, como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, sensibilização de terminações nervosas e migração leucocitária para o foco inflamatório (YAMANE *et al*, 2000). Já no século II d.C o romano Celsus descreveu os quatro sinais cardinais observáveis para a inflamação como sendo o tumor (edema), rubor (eritema), calor (elevação da temperatura), dor (“algia”) e a perda funcional foi definida como o quinto sinal.

A instalação e perpetuação do processo inflamatório, assim como os eventos posteriores, são decorrentes da produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como bradicinina, histamina, as inúmeras citocinas e quimiocinas, ou ainda derivados dos fosfolipídios de membrana (prostanóides), entre outros (HLA & NEILSON, 1992).

A inflamação é autoregulada por agentes antiinflamatórios constituindo um processo dinâmico e altamente controlado; porém, em alguns casos os mecanismos reguladores são alterados podendo acarretar destruição e lesão tecidual excessiva assim como perda da função do órgão ou tecido. Várias doenças de caráter destrutivo são acompanhadas de reações inflamatórias exacerbadas, tais como asma, glomerulonefrite, fibrose pulmonar, psoríase e artrite reumatóide (AR), entre outras (MÜLLER, 2002). Uma vez que a inflamação se torna o fator preponderante na sintomatologia dessas moléstias que acometem os indivíduos, a intervenção farmacológica com base em drogas antiinflamatórias é, na grande maioria das vezes, a terapêutica de primeira escolha (MÜLLER, 2002).

Um passo importante no desenvolvimento de processos inflamatórios é o recrutamento de leucócitos até o local da inflamação (TARRANT & PATEL, 2006). A liberação de mediadores pró-inflamatórios em consequência de danos teciduais induz uma mudança rápida na propriedade de adesão das células endoteliais (DÍAZ-GONZALES & SÁNCHEZ-MADRID, 1998). A cascata de eventos inflamatórios inclui rolamento de leucócitos mediados por selectinas no endotélio

vascular, rápida ativação de integrinas com subsequente adesão firme aos ligantes endoteliais, transporte transendotelial (diapedese) e migração das células inflamatórias pelos tecidos em resposta aos quimiotáticos até o sítio inflamatório (TARRANT & PATEL, 2006).

A migração celular é iniciada com o rolamento dos leucócitos ao longo do endotélio por interações com receptores, principalmente da família das selectinas, mas também ICAM 1 e 2, VCAM-1, PCAM, CD31 e JAM, entre outros receptores (Figura 3). As selectinas são glicoproteínas transmembranares do tipo 1, dependentes de cálcio, sendo denominadas em relação às células onde são predominantemente expressas. A P-selectina (CD62P), expressa constitutivamente, é estocada em plaquetas e no endotélio, sendo liberada imediatamente após o estímulo, tornando-se importante na fase aguda do processo. Já a E-selectina (CD62E) é sintetizada *de novo* e expressa no endotélio a partir da estimulação por mediadores pró-inflamatórios, sendo de grande importância no recrutamento de células inflamatórias, principalmente na inflamação crônica da artrite reumatóide (AR). A L-selectina (CD62L) é a única que medeia recrutamento de linfócitos em vênulas maiores de tecidos linfáticos, sendo que em condições inflamatórias parece exercer um papel secundário às demais selectinas (KELLY *et al*, 2007).

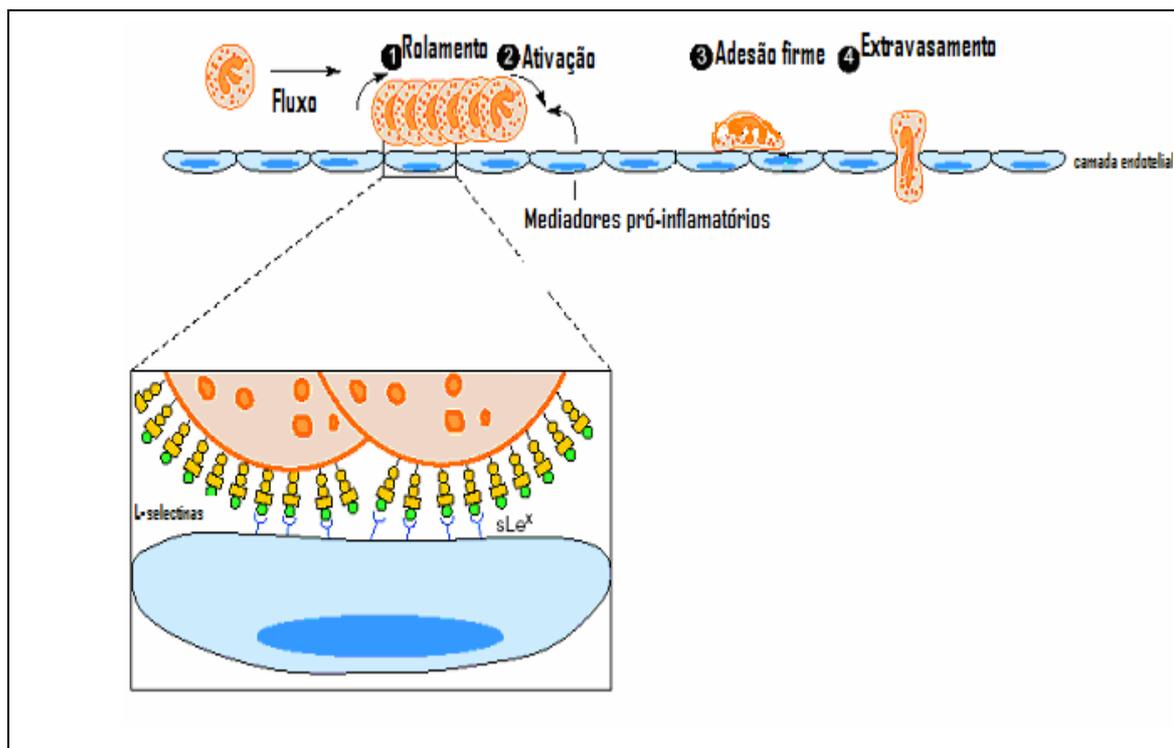


Figura 3: Cascata de adesão entre leucócitos e células endoteliais durante o processo de migração celular, com destaque para as moléculas de adesão (selectinas) (adaptado de DÍAZ-GONZALES & SÁNCHEZ-MADRID, 1998).

O rolamento leucocitário mediado por selectinas é um alvo de ação farmacológica para a redução de processos inflamatórios crônicos, que podem gerar dano tecidual e comprometimento funcional. O tráfego de leucócitos até o sítio inflamatório sinovial articular é dependente dessas moléculas de adesão, sendo a expressão da selectinas bastante elevada em pacientes com AR. Esses níveis tendem a cair com a remissão da doença após terapias com bloqueadores de TNF- α (TAK et al, 1996).

Assim, a migração de leucócitos até o sítio inflamatório é um processo altamente regulado, que pode constituir uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide. Moléculas de adesão, bem como interações entre receptores e quimiocinas que regulam migrações específicas, são alvos ideais para reduzir a resposta inflamatória (TARRANT & PATEL, 2006).

Foi demonstrado que diversos antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) como indometacina, diclofenaco, cetoprofeno, aspirina, aceclofenaco, ácido mefenâmico e ácido flufenâmico inibem fortemente a interação neutrófilos-células endoteliais *in vitro* na fase de rolamento mediada por selectinas (DÍAZ-GONZALES et al, 1996). Conseqüentemente, o

bloqueio de selectinas tem atraído grande atenção durante a última década como estratégia promissora de intervenções terapêuticas (FRITZSCHE et al, 2006).

As glicoproteínas da família das selectinas são caracterizadas por um domínio amino-terminal de lectina de reconhecimento de carboidratos, ligado a um domínio de fator de crescimento epidermal (EGF), além de uma série de repetições consensuais atadas ao segmento transmembranar e uma curta cauda citoplasmática. Apenas o domínio de lectina onde ocorre a interação com carboidrato é crucial para a adesão celular; porém, alguns estudos sugerem que o fator de crescimento e as repetições consensuais contribuem para a especificidade da ligação com os ligantes (KANSAS et al, 1994 e TU et al, 1996).

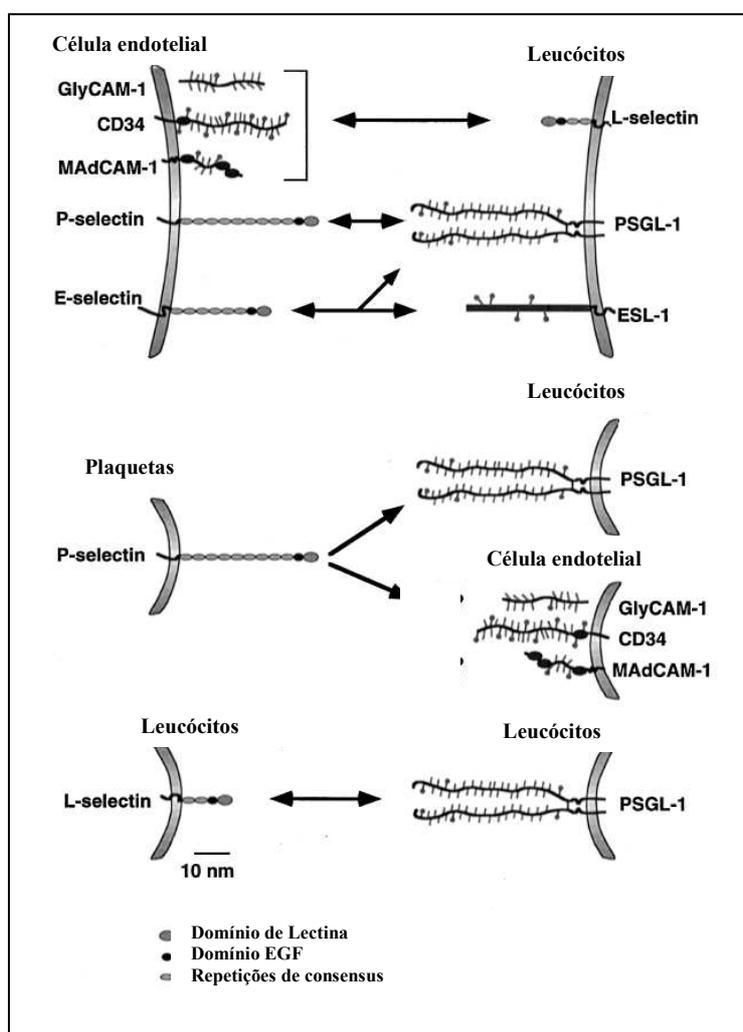
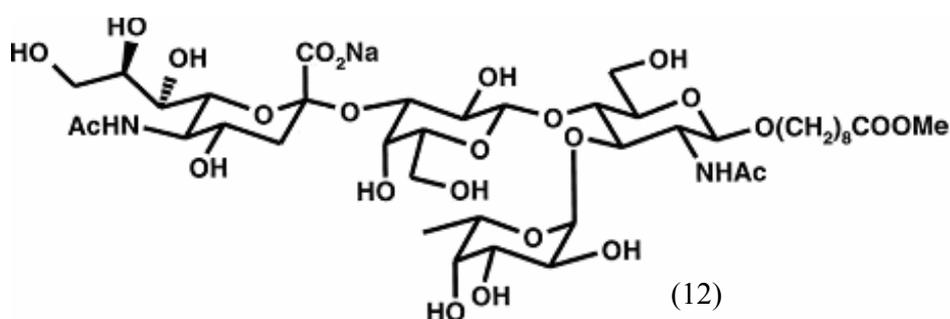


Figura 4: Esquema de representação das selectinas e seus ligantes naturais (adaptado de MCEVER et al, 1997).

A estrutura mínima de reconhecimento das 3 selectinas é o tetrassacarídeo sialil Lewis^x (sLe^x) (12) (FRITZSCHE et al, 2006 e MCEVER et al, 1997). Glicanas sialiladas e fucosiladas como o sLe^x compõem o GlyCAM-1, ligante fisiológico de L-selectina sintetizado por células endoteliais de vênulas linfáticas, sendo importante para a interação entre

GlyCAM-1 e L-selectina no processo de adesão celular (KOENIG et al, 1997). Em estudo mais recente demonstrou-se, em modelo de adesão celular em monocamada, que sialil 6-sulfoLe^x e o sLe^x são ligantes para as três selectinas, sendo o sialil 6-sulfoLe^x mais específico para a L-selectina (OHMORI et al, 2002). Assim, as selectinas interagem com essas substâncias que se encontram ligadas a glicoproteínas e glicolipídeos presentes na maioria dos leucócitos e de algumas células endoteliais (MCEVER et al, 1997).

A inibição da interação das selectinas com seus ligantes é uma estratégia promissora para a obtenção de novas drogas antiinflamatórias. Efeitos benéficos de sLe^x e vários derivados foram demonstrados em modelos de doenças inflamatórias, incluindo experimentos com lipopolissacarídeos (LPS) induzindo adesão em vênulas mesentéricas de ratos (NORMAN et al, 1998).

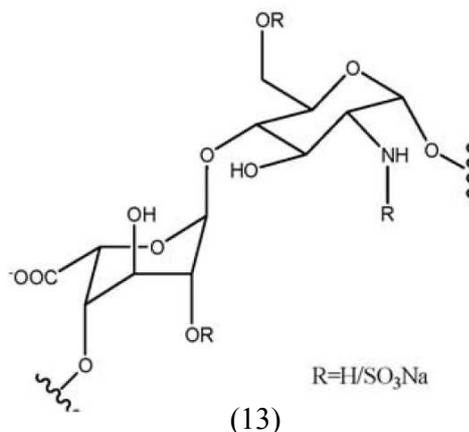


Alguns polissacarídeos sulfatados são capazes de interagir com as selectinas em seu domínio N-terminal diminuindo o rolamento de leucócitos e conseqüentemente a atividade antiinflamatória, efeito demonstrado *in vivo* em modelo de redução de edemas inflamatórios e da concentração de citocinas pró-inflamatórias (FEI et al, 2008).

Polissacarídeos como fucoidina, heparina e derivados sulfatados semi-sintéticos de glicanas vêm sendo estudados quando a capacidade de inibição da adesão celular via selectinas, empregando modelos *in vitro* e *in vivo* de rolamento de leucócitos sobre células endoteliais (FRITZSCHE et al, 2006).

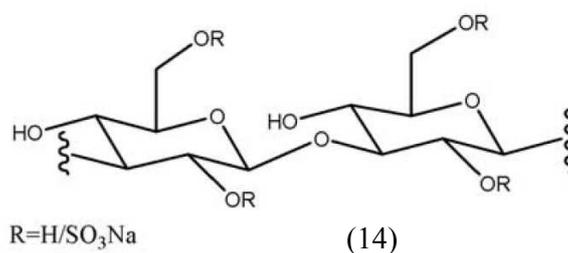
A heparina (13) é um polissacarídeo de origem animal (vertebrados e invertebrados) pertence ao grupo dos glicosaminoglicanos, com alto grau de sulfatação e massa molecular na faixa de 3.000 a 30.000 Da. Devido ao efeito antitrombótico é usada para esse fim desde a década de 60; porém, outras atividades como antiinflamatória e antimetastática foram atribuídas, em parte, ao bloqueio da P-selectina. Devido sua potente atividade anticoagulante

e conseqüente risco de hemorragias, seu uso é limitado nas terapias da inflamação e câncer (FRITZSCHE et al, 2006).

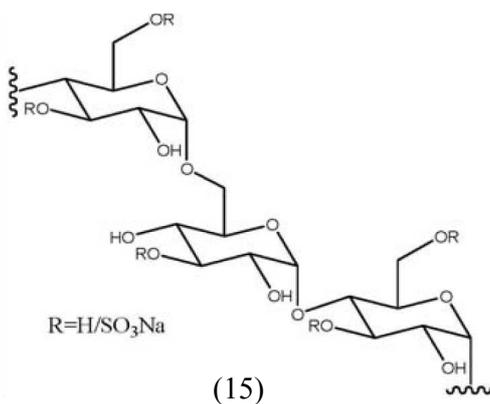


Em estudo recente, glucanas sulfatadas de cadeia linear, além de heparinas, foram avaliadas em relação ao grau de sulfatação (GS), massa molecular e ligação glicosídica em modelo de inibição de P-selectinas *in vitro* e *in vivo*, visando estabelecer relações entre atividade biológica / estrutura química. O bloqueio de P-selectina foi avaliado frente à inibição de adesão celular (FRITZSCHE et al, 2006).

As glucanas comerciais (pululanas, ficarinas e curdlanas) foram submetidas à sulfatação por procedimentos químicos, resultando em polissacarídeos com diferentes graus de sulfatação (FRITZSCHE et al, 2006). Foram avaliadas heparinas com GS de 1,2 e massas moleculares variando de 3,4 a 15 KDa. As ficarinas (14) são constituídas por resíduos de glicose ligados em β na hidroxila do carbono 3 da glicose vizinha. No estudo citado, foram utilizadas ficarinas de massa molecular de aproximadamente 10 KDa e GS variando entre 0 a 2,8. As curdlanas (15) são polissacarídeos de cadeia idêntica à das ficarinas, ou seja, também são polímeros lineares de β -1,3-glicose; porém, apresentam massas moleculares hidrodinâmica de 10 a 17 vezes maiores que a das ficarinas. Segundo os autores, as curdlanas foram úteis para avaliar apenas o parâmetro de massa molecular (hidrodinâmica) e flexibilidade estrutural, fixando-se os parâmetros de GS, ligação e composição da cadeia glicosídica. O GS das curdlanas ensaiadas variaram de 0,16 a 1,78.



As pululanas (15) possuem cadeia glicosídica composta por unidades de maltotriose (α -1,4) ligadas em α -1,6. As pululanas utilizadas no estudo possuíam massa molecular comparável com as ficaranas (10 KDa) e GS variando de 0,23 a 2,0, com o intuito de avaliar a capacidade de bloqueio da P-selectina em relação ao GS e estereoquímica da ligação glicosídica.



Os resultados obtidos indicaram a densidade de carga aniônica como o parâmetro mais importante na inibição de P-selectina (FRITZSCHE et al, 2006). Os derivados com alto grau de sulfatação apresentaram maior porcentagem de inibição do rolamento em relação aos menos sulfatados, o que possibilitou estabelecer uma correlação entre grau de sulfatação e atividade biológica. Ficaranas não sulfatadas ou com baixo GS (0,75) foram incapazes de inibir *in vitro* a adesão celular via P-selectina, quando avaliadas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Porém, polissacarídeos dessa classe com GS superior a 1,5 reduziram a adesão celular em até $32,6 \pm 7,6\%$. De maneira semelhante, pululanas com mesma massa molecular das ficaranas e GS superior a 1,5 inibiram eficientemente a adesão celular, enquanto as menos sulfatadas foram inativas.

A ligação glicosídica dos polissacarídeos também interferiu na atividade inibitória, sendo a pululana mais ativa que a ficarina com grau de sulfatação (GS \sim 2) e massa molecular (\sim 10KDa) idênticos. Já a massa molecular foi o parâmetro de menor relevância para a inibição de P-selectina; contudo, curdlanas de mesmo GS apresentaram atividade inibitória superior à das ficaranas. Uma faixa mínima de massa molecular pode ser necessária para inibição da adesão, conforme sugerido pela inatividade da heparina de baixa massa molecular (3,4 KDa).

A fucana sulfatada reduziu para $56,0 \pm 8,1\%$ a adesão celular, quando avaliada na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, em comparação com adesões na ordem de $68,2 \pm 6,4\%$ para

heparinas comerciais e de $32,6 \pm 7,6\%$ para ficarinas (GS = 1,8), ensaiadas na mesma concentração. A pululana (GS = 2,0) e a curdlana (GS = 1,78) foram as mais ativas, reduzindo a adesão para aproximadamente 10 e 20%. No mesmo estudo foram avaliadas as atividades da ficarana (GS = 1,8) e de uma heparina comercial (MM = 15 KDa; GS = 1,2) em modelo de inibição de rolamento de plaquetas *in vivo*. Nesse modelo, um anticorpo anti-P-selectina diminuiu a porcentagem de rolamento de $32,9 \pm 10,6\%$ para $17,2 \pm 9,3\%$ demonstrando a participação de outros receptores de adesão nesse processo. A ficarana (25 mg/Kg) reduziu de $46,9 \pm 20,9\%$ para $23,4 \pm 12,9\%$ o rolamento, sendo esta atividade considerada idêntica à do anticorpo (FRITZSCHE et al, 2006).

A importância da sulfatação para interação com selectinas na inibição do rolamento já havia sido relatada por outros pesquisadores. Tangelder e Arfors (1991) concluíram que a presença do grupo sulfato é essencial para atividade inibitória do rolamento devido à ausência de efeito observada para polissacarídeos neutros ou com carga negativa oriunda de ácido urônico. Utilizando modelo *in vivo* de inibição do rolamento de leucócitos em vênulas mesentéricas de coelhos, os mesmos autores demonstraram que a inibição induzida por dextrana sulfatada independente da massa molecular, que nesse experimento variou de 13 a 500 KDa. Já o GS foi o parâmetro mais relevante, em conformidade com resultados de outros grupos (FRITZSCHE et al, 2006), observando-se inibições da ordem de 90% para dextrana com GS de 0,13, ensaiada na concentração de 104 mg/Kg, enquanto para dextranas com maior grau de sulfatação (GS = 0,7 e 2) as doses para alcançar a mesma magnitude foram de apenas 56 e 23 mg/Kg. Xilanas sulfatadas (MM = 6 KDa; GS = 1,8) e heparina também foram avaliadas e apresentaram inibição de 90% do rolamento com doses de 11 e 97 mg/Kg, respectivamente. Assim, apesar da menor massa molecular, a xilana sulfatada foi o polissacarídeo mais ativo nesse experimento (TANGELDER e ARFORS, 1991).

Em estudo mais recente, relatou-se o efeito de um polissacarídeo isolado de folhas *Ginkgo biloba* na redução do edema induzido por xilol em ratos, em peritonite na fase aguda (FEI et al, 2008). O polissacarídeo, com massa molecular de 10 KDa, é constituído por galactose, manose, glicose, arabinose, ramnose e ácido galacturônico na proporção molar de 6:2,4:1,7:4,6:6,8:1. A redução de edema foi dose dependente com inibições de 36,8; 56,09 e 64,27 %, respectivamente nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/Kg. No modelo de peritonite por transmigração de neutrófilos induzida por tioglicolato, doses de 5 e 25 mg/Kg geraram inibições de 46,4 e 78,1% em relação ao controle positivo. Já a dose de 50 mg/Kg aboliu totalmente a transmigração de neutrófilos. Para investigar o mecanismo da atividade antiinflamatória foram utilizados modelos *in vitro* de inibição da adesão de neutrófilos sendo

observadas inibições da ordem de 71,38 e 87,61%, para concentrações ensaiadas de 0,1 e 0,5 mg/mL, respectivamente. Nas mesmas concentrações, o polissacarídeo aboliu completamente a adesão de neutrófilos humanos via P-selectinas expressas em células HL-60, utilizando modelo *in vitro* de citometria de fluxo. O efeito antiinflamatório foi, então, atribuído à inibição da interação de P-selectinas e seus ligantes (FEI et al, 2008).

Como citado, diversos são os modelos animais utilizados como instrumentos para estudar a inibição da adesão celular via selectinas tanto *in vitro* como *in vivo*. A capilaroscopia *in vivo* permite visualizar o movimento dos leucócitos na corrente circulatória em capilares de tecidos finos ou transparentes e sua aderência no endotélio, com posterior migração para o interstício. Dessa forma, a visualização de todo processo de migração celular, fase a fase, é possível quando se utiliza essa técnica de microscopia intravital. Em um leito vascular residente, de um tecido cuja visualização é possível com o auxílio de um microscópio comum (translúcidos), as imagens podem ser capturadas por uma câmera de vídeo, gravadas e posteriormente analisadas (CARA & KUBES, 2004) sendo o modelo adotado no presente trabalho.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Equipamentos

- Agitador magnético Corning, modelo PC-420.
- Balança analítica AB 204, Mettler Toledo, com precisão de 1,0 mg.
- Balança analítica BP 210D, Sartorius, com precisão de 0,01 mg.
- Balança semi-analítica NC 1080, Núcleo.
- Banho-maria Fanem, modelo 120/4.
- Câmera de vídeo 5100 HS; Panasonic, Osaka, Japan
- Centrífuga Fanem, modelo 205-N.
- Centrivap modelo A50, Labconco.
- Espectrofotômetro de infravermelho Perkin-Elmer FT-IR, modelo Spectrum One (Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR).
- Estufa ventilada Fanem, modelo 315/9.
- Evaporador rotatório Büchi, modelo B-480.
- Fonte de luz ultravioleta Spectroline, modelo 977 C.
- Leitor de ELISA, Bio-Rad, modelo 550.
- Medidor de pH Marconi, modelo PA200
- Microcentrifuga Cientec, modelo 14000D.
- Micropipeta Eppendorf, volume ajustável de 100 – 1000 μL , modelo 3111000.165.
- Micropipetas Transferpette-Brand, volume ajustável de 20-200 μL e 100 - 1000 μl , modelo 704178.
- Microscópio ótico, 5100 HS; Panasonic, Osaka, Japan MinivortexVWR, modeloMV1.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters 2695, composto de injetor automático, bomba quaternária L-6200^a com degaseificador de linhas e detector de arranjos de diodos PDA 2996 e sistema computadorizado operado pelo *software* Empower Waters.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa Shimadzu, composto de injetor manual, bomba quaternária LC8A, controlador de sistema SCL-8^a, detector de índice de refração RID-6^a e integrador CR4A.
- Sistema de purificação de água Millipore, modelo Milli-Q_{plus}.

4.1.2 Reagentes

- Acetonitrila e metanol grau HPLC, Merck.
- Ácido glicurônico, Acros Organics, pureza $\geq 98\%$.
- Ácido sulfâmico, Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99\%$.
- Albumina sérica bovina (BSA), Sigma-Aldrich, pureza de 96%.
- Anisaldeído, Merck.
- Ácidos grau P.A: ácido trifluoroacético e ácido sulfúrico, Merck.
- Azida sódica, Synth.
- Carbonato de sódio P.A, Synth.
- Cloreto de bário P.A, CRQ.
- Cloreto de sódio anidro P.A , Synth.
- Coomassie Brilliant Blue G-250, Sigma-Aldrich, pureza $\geq 90\%$.
- D-Galactose, Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99\%$.
- D-xilose, Vetec, pureza 99%.
- Fenol P.A, Synth.
- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A., Synth, pureza 99%.
- Fucoidina, Sigma-Aldrich
- Gelatina, Laboratório Difco.
- Hidróxido de sódio, Merck.
- *m*-hidrodixifenil, Sigma-Aldrich, pureza 85%.
- Nitrato de sódio P.A, Proquímios.
- Pululanas, Shodex Standard P-82, Sigma-Aldrich.
- Sulfato de potássio, Quimex, pureza 99%.
- Solventes grau P.A Quimex: *n*-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, éter etílico, metanol, etanol absoluto, piridina.
- Tetraborato de sódio, Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99\%$.
- Trietilamina, Sigma, pureza $\geq 99\%$.
- Xilasina,

4.1.3 Materiais de consumo

- Coluna LiChrospher 100 RP-18 (125 × 4 mm d.i., 5 μ m; Merck).
- Coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm d.i., 5 μ m; Merck).

- Coluna Ultrahydrogel Linear (300 × 7,8 mm d.i., Waters).
- Colunas cromatográficas de vidro 25 × 3 cm d.i.; 37 × 3 cm d.i e 45 × 3 cm d.i.
- Cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm.
- Frascos de penicilina com tampa de borracha.
- Frascos de vidro com tampa e septos de teflon para HPLC, Merck.
- Frascos plástico do tipo *safe lock*, 2 mL de capacidade, Netheler e Hinz.
- Membrana de celulose, 33 mm, *cut off* 10000 Da, Sigma-Aldrich.
- Papel de filtro qualitativo.
- Papel indicador de pH 0-14, Merck.
- Pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm d.i., 5µm; Merck).
- Pré-coluna Ultrahydrogel Linear, Waters.
- Sephadex G-25, 100-300 µm, Sigma -Aldrich.
- Sephadex G-100, 40-120 µm, Sigma-Aldrich.
- Q Sepharose Fast Flow aniônica, Sigma-Aldrich.
- Termômetro 20-110 °C, VWR.
- *Vials* de vidro para HPLC com septos de silicone e tampas de politetrafluoretileno, Merck.
- Vidrarias diversas.

4.1.4 Material ficológico

A alga *Lithothamnion calcareum* foi fornecida pulverizada pela empresa Phoster Algamar. Segundo informações da empresa, a coleta foi realizada na região costeira do Espírito Santo. O material ficológico é empregado pela empresa para a manufatura do produto Vitalidade +50[®], com o registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária sob número 6.2119.0001.001.1.

4.1.5 Obtenção dos extratos brutos

4.1.5.1 Extratos orgânicos

O material ficológico seco e pulverizado foi submetido à extração por agitação em ultrassom com diferentes solventes (etanol, diclorometano e acetato de etila) separadamente. Para cada 50g do material foram utilizados 500 mL de solvente orgânico, sendo a extração realizada durante 2 h. O solvente foi evaporado em rotavapor sob pressão reduzida e

temperatura máxima de 50 °C. A massa obtida em cada extração foi de aproximadamente 2 mg, correspondente a rendimento de 0,004% (m/m). O baixo rendimento encontrado direcionou o estudo para adoção de métodos de extração e isolamento de polissacarídeos de ocorrência já relatada na ordem Corallinales (BILAN & USOV, 2001).

4.1.5.2 Extrato aquoso à temperatura ambiente (LTF)

O material ficológico seco (450 Kg) foi submetido à pulverização em moinho de bolas por via úmida com 75 L de água potável, à temperatura ambiente, por 6 horas. Procedeu-se à filtração a vácuo e uma alíquota de 5 L do filtrado foi concentrada em evaporador rotatório, à temperatura de 60 °C e pressão reduzida. O extrato obtido foi submetido ao processo de obtenção das frações polissacarídicas (item 4.1.6), incluindo diálise, e a massa obtida foi de 130 mg (FP), correspondente a rendimento de 0,0004% (m/m). A torta resultante da filtração foi seca em estufa a 60 °C e utilizada nas extrações posteriores (itens 4.1.5.3).

4.1.5.3 Extrato aquoso a quente (LTQ)

Porções da torta obtida conforme descrito no item 4.1.5.2 foram submetidas à extração aquosa por 6 horas, com agitação mecânica, em diferentes temperaturas (100, 80, 70, 60 e 40°C). A relação torta/solvente extrator (água destilada) foi de 5% (m/v) em todos os procedimentos. Após filtração a vácuo, os extratos aquosos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura máxima de 60°C até aproximadamente 10% (v/v) do volume inicial. Posteriormente, os extratos foram submetidos às etapas para obtenção das frações de polissacarídeos (item 4.1.6). As frações de diferentes temperaturas foram agrupadas (QP) e a extração à temperatura de 60 °C foi selecionada para extrações posteriores, devido ao maior rendimento apresentado (vide Resultados e Discussão, Tabela 5).

4.1.5.4 Extração básica (LTQB)

Porções da torta obtida em 4.1.5.3 foram submetidas à extração básica com agitação mecânica a 60 °C, por 2 horas. Soluções aquosas de Na₂CO₃ nas concentrações de 1, 2 e 3 % (m/v) foram utilizadas seqüencialmente para extração. A relação entre torta / solvente extrator foi de 5% (m/v). Após filtração a vácuo, os extratos foram concentrados até 10% do volume inicial em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura máxima de 60°C. Após as

etapas subseqüentes para obtenção das frações de polissacarídeos (item 4.1.6), as frações resultantes foram denominadas de B1P e B2P, de acordo com a concentração da solução de Na_2CO_3 utilizada em cada extração (1% ou 2%, respectivamente). As extrações foram repetidas visando obter maiores massas, excetuando a extração com 3% de Na_2CO_3 que apresentou baixo rendimento (vide Resultados e Discussão, Tabela 6).

4.1.5.5 Extração ácida

Porções da torta obtida em 4.1.5.2 foram submetidas à extração ácida por agitação mecânica a temperatura ambiente, durante 24 horas. Como solvente extrator, foi empregada solução aquosa de HCl na concentração de 1 mol/L. A relação entre a torta e o solvente extrator foi de 5% (m/v). Uma porção de 100 g da torta resultou em uma fração de 5 mg de polissacarídeos (item 4.1.6). Tendo em vista o baixo rendimento obtido (0,005%), optou-se por não repetir este método de extração.

4.1.6 Obtenção das frações de polissacarídeos

Os extratos concentrados obtidos, correspondentes a 10% do volume inicial das extrações (itens 4.1.5.2 a 4.1.5.5), foram diluídos com água destilada até total solubilização, seguindo-se precipitação em etanol. Para tanto, adicionou-se etanol à solução aquosa, na proporção de 4:1 (etanol: água) e a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm, à temperatura ambiente, por 10 min. A fim de purificar o precipitado obtido, esse foi ressuspensionado sucessivas vezes em etanol absoluto e novamente centrifugado. Na seqüência, os precipitados foram dialisados em membrana de celulose, com valor de exclusão (*cut off*) de aproximadamente 10.000 Da. Nas extrações básicas (item 4.1.5.4), foi utilizada solução aquosa de HCl (0,1 M) para eliminação do carbonato residual, sendo a solução posteriormente neutralizada com solução de NaOH (0,1 M) anteriormente à diálise. O pH foi medido com auxílio de papel indicador.

O fluxograma (item 5.1) representa as etapas de extração e obtenção das frações de polissacarídeos adotadas no presente trabalho. As frações obtidas (FP, QP, B1P e B2P) foram submetidas à análise espectroscópica para caracterização estrutural e confirmação do caráter polissacarídico. As frações foram posteriormente cromatografadas visando isolar os polissacarídeos constituintes, seguindo-se sua caracterização estrutural e avaliação da atividade biológica.

4.1.7 Perfis cromatográficos por RP-HPLC e HPSEC

4.1.7.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em frascos plásticos e solubilizadas em água destilada e deionizada (Mili-Q), na concentração de 5mg/mL. As amostras foram solubilizadas manualmente, com agitação suave, pois degradações podem ocorrer pela sonicação de polissacarídeos (NAVARRO et al., 2007), seguindo-se centrifugação a 10.000 rpm por 10 min. Alíquotas de 10 μ L do sobrenadante foram injetadas de modo automático em sistema de HPLC (Waters).

4.1.7.2 Condições cromatográficas

Para obtenção do perfil cromatográfico utilizou-se sistema de eluição em gradiente e fase estacionária inversa (RP-HPLC). As análises foram realizadas em coluna LiChospher-100 RP-18 (partículas de 5 μ m, 125 \times 4mm d.i., Merck), fluxo de 1 mL/min, à temperatura de 30 °C e detecção no ultra-violeta (UV) no comprimento de onda de 210 nm. Os espectros no UV, na faixa de 210 a 400 nm, foram registrados, para cada pico, pelo detector de arranjo de diodos. A eluição em gradiente empregada encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Gradiente de eluição utilizado para obtenção dos perfis cromatográficos por RP-HPLC.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Água (%)</i>	<i>Acetonitrila (%)</i>
0	95	5
60	5	95
65	5	95
70	95	5

Também foram obtidos perfis por cromatografia de exclusão por tamanho (*High Performance Size Exclusion Chromatography* - HPSEC) em coluna Ultrahydrogel Linear (300 \times 7,8 mm d.i. Waters) e detecção no UV em 210 nm. A eluição isocrática com água ultrapura e fluxo de 0,6 mL/min foi realizada à temperatura ambiente. Os espectros no UV, na faixa de 210 a 400 nm, foram registrados, para cada pico, pelo detector de arranjo de diodos.

4.1.8 Caracterização estrutural dos polissacarídeos

4.1.8.1 Espectroscopia no UV/VIS e reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico

Para obtenção dos espectros utilizou-se espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 20, na temperatura de 25 °C. Foram usadas cubetas de quartzo, de caminho óptico de 1 cm e abertura de fenda de 2 mm. Realizou-se varredura de 200 a 500 nm, empregando-se água deionizada como branco. As amostras foram solubilizadas inicialmente em água, na concentração de 1 mg/mL, sendo posteriormente diluídas a 0,33 mg/mL.

Assim, para 0,5 mL de solução da amostra foram adicionados 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 mL de solução aquosa de fenol a 5 % (m/v) em tubo de vidro, seguido de 10 min de repouso e posterior homogeneização em vortex. Na seqüência, os tubos foram mantidos em banho à temperatura ambiente por 20 min, realizando-se então a leitura em espectrofotômetro.

4.1.8.2 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR, à temperatura ambiente. As amostras foram analisadas segundo vibrações e rotações moleculares nas frequências de 4.000 a 650 cm^{-1} .

4.1.8.3 Açúcares totais

Para determinação de açúcares totais utilizou-se a reação de fenol-ácido sulfúrico, porém com adaptações para realizar o ensaio em microplaca, a partir do método descrito por Masuko e colaboradores (2005).

Foram preparadas soluções de referência, utilizando galactose como padrão, a partir de diluição da solução estoque (5,0 mg/mL) que foi armazenada em refrigerador. Para o preparo da solução estoque foram pesados 50 mg de galactose, seguindo-se solubilização com água destilada e transferência para balão volumétrico de 10 mL, com posterior aferição do volume. Com o auxílio de pipetas de vidro graduadas e micropipetas foram transferidas alíquotas de 2,0; 1,6; 1,2; 0,8; 0,4 e 0,2 mL da solução estoque para balões volumétricos de 10 mL visando o preparo das soluções nas concentrações de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 mg/mL, respectivamente, sendo os volumes ajustados com água destilada. As soluções resultantes da diluição da solução estoque foram preparadas nos dias dos ensaios.

Para o preparo das soluções amostra foram pesados 5 mg das amostras seguido de solubilização com água destilada e transferência para balões volumétricos de 5 mL com posterior aferição do volume.

Com o auxílio de micropipeta, 50 μ L da solução da amostra (1 mg/mL) ou solução padrão (nas concentrações de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 mg/mL) ou água destilada (branco) foram transferidos para o poço da microplaca, seguida da adição de 150 μ L de ácido sulfúrico concentrado P.A. e 30 μ L de solução aquosa de fenol a 5 % m/v. A microplaca foi mantida em banho-maria, à temperatura de 90 °C, por 5 min, seguindo-se resfriamento por também 5 min, em banho-maria a 25 °C. Na seqüência, foi realizada a leitura da absorbância em 490 nm, em leitor de microplaca.

Foram construídas curvas de calibração utilizando-se galactose como substância de referência, sendo cada concentração analisada em replicata ($n = 8$), descontando-se o valor da absorbância média do branco da reação. Os valores obtidos foram submetidos à análise de regressão linear empregando-se o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software 4.0, 2003), para cálculo do coeficiente de determinação (r^2).

Devido à ausência de linearidade da curva, nas concentrações analisadas do padrão de galactose, procedeu-se à análise de açúcares totais por método em tubos de ensaio e leitura em espectrofotômetro no UV-VIS.

Assim, para a determinação de açúcares totais pelo método de fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956) procedeu-se conforme descrito anteriormente (item 4.1.8.1). As soluções amostra (1 mg/mL) sem hidrólise prévia e as soluções padrão (1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 g/L) foram analisadas em triplicata descontando-se o branco da reação (água), sendo as leituras realizadas em 490 nm. As amostras e as soluções padrão foram preparadas conforme descrito anteriormente, sendo analisadas em triplicata descontando-se o valor da absorbância média do branco da reação.

Foram construídas 3 curvas de calibração as quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (análise de covariância, $p > 0,05$) empregando-se o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software 4.0, 2003). Portanto, os dados foram reunidos em uma única curva e os resultados da quantificação expressos em porcentagem de açúcares totais seguido do desvio padrão. O cálculo da porcentagem foi realizado a partir de fator de resposta, obtido pela análise de solução padrão de galactose na concentração de 0,5 mg/mL ($n = 3$), preparada no dia do ensaio, empregando-se a equação descrita a seguir.

$$\frac{A_{\text{amostra}} \times C_{\text{padrão}}}{A_{\text{padrão}}} = C_{\text{amostra}}$$

Sendo :

A_{amostra} : Absorbância média da amostra descontando-se a média do branco da reação.

C_{amostra} : Concentração de açúcares totais na amostra

$A_{\text{padrão}}$: Absorbância média do padrão descontando-se a média do branco da reação.

$C_{\text{padrão}}$: Concentração do padrão utilizada no ensaio em mg/mL

$C_{\text{amostra total}}$: Concentração da amostra

Os resultados foram expressos em termos percentuais, a partir da equação:

$$\frac{C_{\text{amostra}} \times 100}{C_{\text{amostra total}}} = \% \text{ (m/m)}$$

Cálculos similares foram empregados nas demais quantificações (itens 4.1.8.4 a 4.1.8.6). O desvio padrão foi calculado empregando-se o programa Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, 2003).

4.1.8.4 Quantificação de sulfato

O teor de sulfato foi determinado pelo método turbidimétrico relatado por Dodgson e Price (1962), baseado na precipitação de sulfato de bário em gelatina.

As amostras foram previamente submetidas à hidrólise ácida em solução aquosa de HCl (2 mol/L), sob refluxo, à temperatura de 105 a 110 °C, em banho de vaselina líquida, por 4 h.

Para os doseamentos, pesaram-se 2 g de gelatina que foram dissolvidos em 400 mL de água, à temperatura de 60 a 70 °C, seguindo de armazenamento em geladeira (~ 4°C) durante a noite. Na seqüência, foram adicionados 2 g de cloreto de bário (BaCl₂) ao fluido gelatinoso, sendo o reagente utilizado nos ensaios 2 horas após o preparo. O reagente gelatina-BaCl₂ foi conservado em geladeira, por no máximo sete dias.

As soluções de referência foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de sulfato de potássio (K₂SO₄) de concentração igual a 5,0 mg/mL em água destilada, a qual foi armazenada em refrigerador. As diluições procederam com transferências de alíquotas para

balões volumétricos, com o auxílio de pipetas graduadas de vidro e micropipetas, sendo a aferição do volume realizada com água destilada. Foram preparadas soluções nas concentrações de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 mg/mL, as quais foram analisadas em triplicata. As soluções amostra foram obtidas conforme descrito no método para quantificação de açúcares totais (item 4.1.8.3)

Em tubo de ensaio de vidro, adicionaram-se 200 μ L da solução amostra (1 mg/mL), solução de referência (concentrações de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 mg/mL) ou água destilada (branco), seguindo-se adição de 3,8 mL de solução aquosa de ácido trifluoroacético (3% m/v) e 1 mL do reagente de gelatina-BaCl₂. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 20 min, em repouso, com posterior agitação em vortex, previamente à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 360 nm.

Foram construídas 3 curvas de calibração as quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), segundo análise pelo programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, 1998-2003). Desta forma, as médias foram utilizadas para construção de uma única curva, que foi submetida à análise de regressão linear, empregando-se o mesmo programa, obtendo-se a equação da reta correspondente. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem seguido do desvio-padrão com o auxílio do programa Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, 2003), como apresentado na Tabela 8.

4.1.8.5 Quantificação de ácido urônico

O método utilizado para quantificação de ácido urônico foi o padronizado por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

A solução de ácido sulfâmico–sulfamato de sódio (4 mol/L) foi preparada pela diluição de 3,88 g de ácido sulfâmico em 5 mL de água destilada, sendo adicionadas gotas de solução saturada de KOH até completa solubilização do ácido. Posteriormente, o pH da solução foi ajustado para 1,6 com solução saturada de KOH. A solução foi então transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume aferido com água destilada. O reagente foi estocado à temperatura ambiente, por tempo indeterminado.

A solução de *m*-hidroxidifenil (0,5 % m/v) foi preparada pela solubilização do reagente em solução aquosa de NaOH (0,5 % m/v), sendo armazenada em frasco âmbar e mantida em geladeira por no máximo duas semanas.

A reação colorimétrica ocorre em meio ácido, na presença de H₂SO₄ concentrado P.A, ao qual se adicionou tetraborato de sódio (75 nmol/L), sendo esse solubilizado sob agitação mecânica por toda noite.

Para preparo das soluções padrão de referência foi preparada uma solução estoque de ácido glicurônico (1,0 mg/mL) pesando-se 5mg e solubilizando com água destilada, com posterior transferência para balão volumétrico de 5 mL seguido de aferição do volume. A solução estoque foi armazenada em refrigerador sendo diluída nos dias do experimento para a concentração de 0,1 mg/mL pela transferência de 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e aferição do volume com água destilada. Com o auxílio de micropipetas, alíquotas de 450, 350, 250, 150 e 100 µL dessa solução foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL, sendo o volume aferido com água destilada, resultando em soluções com concentrações de 0,09; 0,07; 0,05; 0,03 e 0,02 mg/mL, respectivamente.

As soluções amostra foram preparadas pesando-se 5 mg, que foram transferidos para balões volumétricos de 5 mL com posterior aferição do volume com água destilada.

O experimento consistiu na adição de 400 µL da solução amostra (1 mg/mL) ou padrão (concentrações variadas) ou água destilada (branco) em tubo de vidro, com posterior acréscimo de 40 µL da solução de ácido sulfâmico-sulfamato de sódio (4 mol/L, pH 1,6) e agitação em vortex. Na seqüência, foi adicionado o reagente H₂SO₄-tetraborato de sódio (2,4 mL) e novamente a reação foi agitada. Os tubos foram, então, mantidos em banho-maria a 100 °C por 20 min, seguido de resfriamento brusco em banho de gelo. Depois de alcançada a temperatura ambiente, a solução de *m*-hidroxidifenil (80 µL) foi adicionada, sendo a solução intensamente homogeneizada em vortex por 5 segundos. A leitura, em espectrofotômetro no UV-Vis em 525 nm, foi realizada após transcorridos 10 min da adição da solução de *m*-hidroxidifenil.

Foram construídas 3 curvas de calibração utilizando-se ácido glicurônico como substância de referência, sendo cada concentração analisada em triplicata. Após análise de covariância ($p > 0,05$) empregando-se o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, 1998-2003), que possibilitou constatar equivalência entre as retas, foi construída uma única curva, que foi submetida à análise de regressão linear empregando-se o mesmo programa, para determinação da equação da reta.

As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de ácido urônico seguido de desvio padrão (Tabela 9).

4.1.8.6 Quantificação de proteínas

O método padronizado por Bradford (1976), que utiliza Coomassie Brilliant Blue G-250 para quantificação de proteínas, foi empregado para determinação do teor de proteínas das frações de polissacarídeos.

O reagente foi preparado pela solubilização de 50 mg de Coomassie em 25 mL de etanol (95 %), com posterior adição de 100 mL de solução de ácido fosfórico (85 % m/v), sendo o volume aferido para um litro. As concentrações finais (m/v) do reagente foram de 0,01 % de Coomassie, 4,7 % de etanol e 8,5 % de ácido fosfórico.

Foram preparadas soluções padrão de albumina nas concentrações de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4, 0,2 e 0,1 mg/mL, a partir de diluições da solução estoque (5 mg/mL), que foi preparada nos dias do experimento. Assim, para preparo da solução estoque foi pesado 25 mg do padrão que foi solubilizado e transferido quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL, com posterior aferição do volume com água destilada. As soluções amostra foram preparadas conforme descrito no item 4.1.8.5.

O experimento foi realizado pela adição de 100 μ L da solução amostra (1,0 mg/mL) ou solução padrão (nas concentrações de 1,0; 0,8; 0,6; 0,4, 0,2 e 0,1 mg/mL) ou branco (água destilada) em tubo de vidro, com acréscimo de 5 mL da solução reagente e agitação em vortex para homogeneização. A leitura da absorbância foi feita em 595 nm.

A curva de calibração foi construída utilizando-se albumina sérica bovina como substância de referência, as quais foram analisadas em triplicata para construção da curva. As médias dos valores obtidos foram submetidas à análise de regressão linear, empregando-se o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software 4.0, 2003), para determinação da equação da reta. As amostras foram analisadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de proteínas, seguido de desvio padrão (Tabela 10).

4.1.8.7 Determinação da massa molecular

Os polissacarídeos resultantes do fracionamento (itens 4.1.9.2 e 4.1.9.3) foram analisados por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho (HPSEC) para determinação das massas moleculares. Padrões de pululana de diferentes massas moleculares (Tabela 2) foram empregados como referência. Os padrões (1,0 mg/mL) foram preparados segundo recomendações do fabricante e as amostras conforme descrito no item 4.1.7.1, excetuando injeção manual ao invés de automática de alíquotas de 20 μ L em sistema de cromatografia líquida Shimadzu.

Tabela 2: Padrões de pululana (P-82) utilizados na determinação das massas moleculares dos polissacarídeos de *L. calcareum*.

<i>Padrão (sigla)</i>	<i>Massa molecular</i> <i>($\times 10^4$)</i>
P-800	78,8
P-400	40,4
P-200	21,2
P-100	11,2
P-50	4,73
P-20	2,28
P-10	1,18
P-5	0,59

Os padrões e amostras foram analisados em coluna Ultrahydrogel Linear (300×7.8 mm d.i., Waters), com fluxo de 0,5 mL/min, à temperatura ambiente, procedendo-se a eluição isocrática com solução aquosa de NaNO_3 (0,1 mol/mL) e detecção pelo índice de refração.

Para construção da curva de calibração, cada padrão foi injetado 3 vezes consecutivas e as médias dos tempos de retenção foram plotadas em relação ao logaritmo da massa molecular dos respectivos padrões. A equação da reta e o coeficiente de determinação foram obtidos após análise de regressão linear pelo programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software 4.0, 2003). Os desvios padrão das massas moleculares foram calculados pelo programa Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, 2003).

4.1.9 Fracionamentos cromatográficos

Previamente aos fracionamentos, as frações foram ressuspensas em água destilada (cerca de 15 mL) e agitadas manualmente até máxima solubilização. As soluções foram então centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 min, e os sobrenadantes aplicados cuidadosamente no topo de colunas de vidro, contendo os suportes cromatográficos específicos.

O método de detecção utilizado para monitorar os fracionamentos foi a reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico, adaptado para microplaca, conforme descrito no item 4.1.8.3 (MASUKO et al., 2005). As frações coletadas foram analisadas em triplicata e o perfil gráfico do fracionamento foi construído plotando a absorbância média de cada fração versus o número da fração correspondente.

4.1.9.1 Fracionamento de FP

A fração FP (item 4.1.5.2) foi submetida a dois procedimentos cromatográficos: fracionamento por filtração molecular em Sephadex G-25 e troca iônica em Sepharose Fast Flow.

Para o fracionamento de FP (50 mg) em coluna de Sephadex G-25 (dimensões da coluna empacotada: 37 × 3 cm d.i.) realizou-se eluição com água destilada. Foram desprezados os primeiros 100 mL do eluato, logo após a aplicação da amostra na coluna, correspondente ao “volume morto” (V_0), ou seja, um terço do volume total após empacotamento e expansão da matriz, conforme recomendações do fabricante. Frações de aproximadamente 5 mL foram coletadas e agrupadas conforme perfil de detecção colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico e secas até resíduo em estufa à temperatura de 60 °C.

Já o fracionamento de FP (50 mg) em coluna de troca iônica de Sepharose Fast Flow (dimensões da coluna empacotada: 25 × 3 cm d.i.) foi realizado com eluição em gradiente de solução de NaCl (soluções aquosas a 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mol/L, 100 mL de cada concentração), sendo as frações agrupadas e dialisadas em membrana de celulose (*cut off* 10.000 Da) e posteriormente secas até resíduo em estufa.

As frações resultantes dos fracionamentos foram caracterizadas conforme disponibilidade de massa.

4.1.9.2 Fracionamento de B1P

Dois porções (130 mg cada) de B1P, resultante da extração básica com solução aquosa de Na_2CO_3 a 1 % (item 4.1.5.4), foram refractionadas em coluna de Sephadex G-100 (dimensões da coluna empacotada: 45 × 3 cm d.i., $V_0 = 100$ mL) e eluição com água destilada. Frações de 5 mL foram coletadas e reunidas segundo semelhanças nos perfis da reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico. As frações reunidas, de ambas as colunas, foram secas gerando as massas descritas na Tabela 3. A secagem foi realizada em aparelho Centrivap sob pressão reduzida e temperatura máxima de 50 °C.

Tabela 3: Fracionamento de B1P em coluna de Sephadex G-100.

<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>
B1P 1-19	30,0	B1P 1-13	13,9
B1P 20-31	60,7	B1P 14-21	50
B1P 32-37	5,0	B1P 22-37	45
Total	95,7	Total	108,9

Na seqüência, a fração B1P 20-31 (60,7 mg) foi cromatografada em coluna de Sepharose Fast Flow (dimensões da coluna empacotada: 25 × 3 cm d.i.) com eluição em gradiente de soluções aquosas de NaCl (0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mol/L, 100 mL de cada concentração e $V_0 = 100$ mL). Frações de 5 mL foram coletadas sendo todas frações agrupadas devido ao perfil na reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico indicar apenas uma banda sem possibilidade de separação. A fração foi então dialisada (*cut off* 10000Da) cabendo observar o aparecimento de um precipitado durante a diálise que foi separado da solução por centrifugação a 10000 rpm por 5min. A porção solúvel foi seca à temperatura de 50 °C e pressão reduzida (Centrivap), sendo denominada B1P 20-31FF (13 mg).

4.1.9.3 Fracionamento de B2P

O fracionamento de B2P (150 mg, item 4.1.5.4) foi realizado por cromatografia de filtração molecular em coluna de Sephadex G-100 (dimensões da coluna empacotada: 45 × 3 cm d.i.), conforme descrito para a fração B1P (item 4.1.9.2).

Tabela 4: Fracionamento de B2P em coluna de Sephadex G-100.

<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>
B2P 1-10	23
B2P 11-23	45
B2P 24-35	40
Total	108

4.1.10 Ensaio biológico de inibição de rolamento de leucócitos

O ensaio foi realizado em colaboração com o Prof. Mauro Teixeira (Departamento de Bioquímica) e Prof^a Vanessa Pinho da Silva (Departamento de Morfologia), ICB, UFMG, sendo executado pelo pós-doutorando Gustavo Menez Batista e a doutoranda Fernanda Matos Coelho

Utilizaram-se imagens de microscopia intravital de vênulas do músculo cremáster de camundongos em preparação apropriada. Foram utilizados camundongos C57Bl6 machos, com idade de 8 semanas, pesando entre 25-30 g, cedidos pelo CEBIO-ICB/UFMG. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libidum* em um ciclo claro-escuro de 12/12 horas desde o início dos experimentos.

Os camundongos receberam pré-tratamento sistêmico (injeção intravenosa) da amostra em concentrações de 10 e 100 mg/Kg, sendo solubilizadas em salina e centrifugadas previamente. Camundongos machos, injetados na bolsa escrotal com LPS, foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de xilazina e quetamina (essa mistura não causa alterações hemodinâmicas severas-essas alterações poderiam interferir nos processos de recrutamento de leucócitos). O camundongo anestesiado foi, então, colocado em uma placa contendo sistema de circulação de água a 37°C, importante para manter a temperatura corpórea do animal estável. Uma incisão foi feita na pele do saco escrotal para expor o músculo cremáster, que é cuidadosamente removido da fâscia associada. Usando um cauterizador, uma segunda incisão é feita sobre a superfície ventral do músculo cremáster. O testículo e epidídimos foram separados do músculo e colocado para dentro da cavidade abdominal. O músculo foi, então, aberto sobre uma superfície transparente permitindo a passagem de luz e superfundido com solução salina. Um microscópio (Axiolskip; Carl Zeiss Canada, Don Mills, Ontario, Canada) foi utilizado para examinar a microcirculação presente no tecido. O tecido foi irrigado constantemente com um tampão de bicarbonato (37 °C, pH 7,4). Uma video-câmera (5100 HS; Panasonic, Osaka, Japan) foi usada para projetar as imagens em um monitor e permitir sua gravação em videocassete convencional.

O número de leucócitos rolando, aderente e que tem extravasado para o tecido foi determinado após análise das imagens gravadas. Leucócitos rolando foram definidos como células movendo em uma velocidade menor que aquelas de eritrócitos dentro de um determinado vaso. O número de células rolando será determinado pela contagem de células passando por um determinado ponto marcado no vaso por minuto. Um leucócito será considerado aderente se ele permanecer parado por pelo menos 30 segundos, e o número de

leucócitos aderentes será quantificado contando o número de células aderentes dentro de um comprimento de 100 μm de vaso. Emigração de leucócitos será definido como o número de células presentes no espaço extravascular dentro de uma área de 50 μm de distância da vênula.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização das condições de extração e obtenção de frações polissacarídicas

A extração da alga *L. calcareum* com solventes orgânicos (pág. 38 item 4.1.5.1) resultou em extratos com baixo rendimento (0,004 %). Por essa razão, esses extratos que deveriam conter os constituintes micromoleculares da espécie não foram selecionados para estudo, devido à inviabilidade de se obter massa necessária para isolamento dos constituintes. Assim, priorizou-se a obtenção dos constituintes macromoleculares, obtidos a partir de extrações aquosas seguidas de precipitação da fração polissacarídica em solução hidroalcolica, e posterior isolamento dos polissacarídeos constituintes das frações com maiores rendimentos.

Inicialmente buscou-se otimizar as condições de extração de polissacarídeos de *L. calcareum*, avaliando-se o efeito da temperatura. Os rendimentos das extrações aquosas em diferentes temperaturas estão listados na Tabela 5.

Tabela 5: Efeito da temperatura na extração de polissacarídeos de *L. calcareum*

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
40	0,008
60	0,011
70	0,007
80	0,008
100	0,007

Esses rendimentos correspondem aos precipitados obtidos, após serem submetidos à diálise (item 4.1.3). O maior rendimento foi observado a 60 °C, sendo essa temperatura definida para extrações posteriores, visando obter massas adicionais dos polissacarídeos.

Para as extrações em meio básico, o efeito da concentração da solução de Na₂CO₃ na extração dos polissacarídeos pode ser observado na Tabela 6. Todas essas extrações foram realizadas na temperatura de 60 °C.

Tabela 6: Efeito da concentração da solução aquosa de Na_2CO_3 na extração de polissacarídeos de *L. calcareum*

<i>Fração</i>	<i>Solução</i> <i>Na₂CO₃(m/v)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
B1P	1%	0,032
B2P	2%	0,050
B3P	3%	0,001

O baixo rendimento das extrações (Tabela 6) foi um fator limitante para o estudo, demandando diversas repetições dos processos de extração e precipitação dos polissacarídeos, visando acumular massa necessária para as etapas posteriores de fracionamento e avaliação da atividade biológica. Assim, as extrações básicas foram repetidas sistematicamente sendo todo o processo de extração e obtenção das frações polissacarídicas representado no fluxograma da página 55.

O baixo rendimento pode ser atribuído à ausência de processo de estabilização do material ficológico, após coleta do ambiente marinho, por aquecimento em estufa à temperatura superior a 60 °C em curto tempo de exposição, para diminuição da porcentagem de água e desnaturação protéica de enzimas celulares (POSER, 2007). O material vegetal fornecido para o desenvolvimento da pesquisa foi estocado por aproximadamente 3 meses o que pode ter contribuído para ocorrência de reações de degradação dos polissacarídeos, resultando em rendimentos extrativos baixos. Assim, etapas prévias de estabilização vegetal podem aumentar os rendimentos das extrações dos polissacarídeos sulfatados, resultando em teores compatíveis com os observados em outras algas calcárias (NAVARRO & STORTZ, 2002).

No presente trabalho, a extração ácida (item 4.1.5.5) não apresentou rendimento que viabilizasse as etapas posteriores (0,005% m/m), o que pode ser explicado pela degradação ou hidrólise dos polímeros de carboidratos. Porém, em estudos anteriores realizados com condições semelhantes, os autores relataram rendimentos de extrações ácidas para as algas calcárias *Corallina officinalis*, *Bossiella orbigniana* e *Jania rubens* de até 1,0 % (m/m) (NAVARRO & STORTZ, 2002).

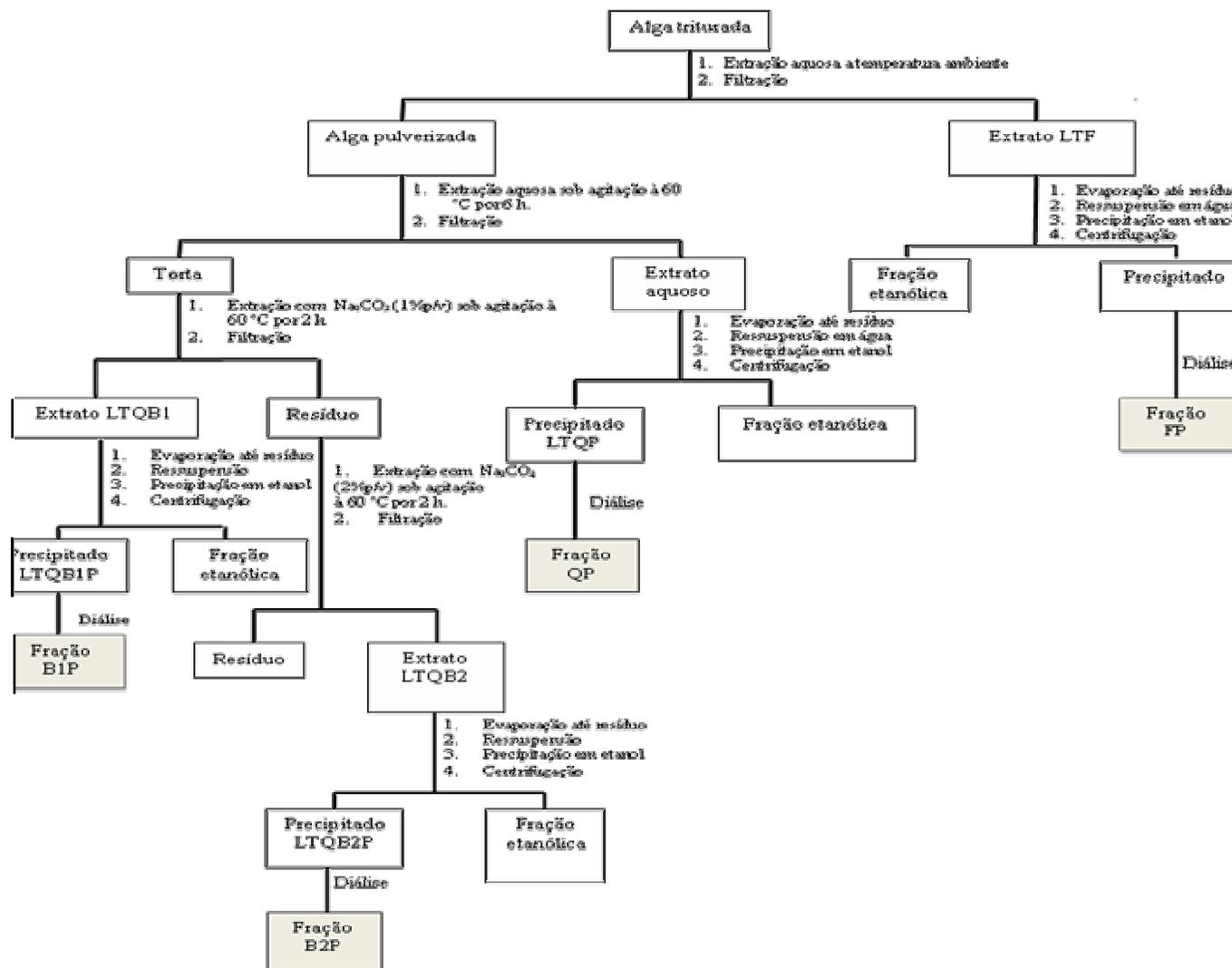


Figura 5: Fluxograma dos processos de extração, isolamento e purificação de polissacarídeos constituintes da alga *L. calcareum*.

5.2 Análise cromatográfica das frações de polissacarídeos por RP-HPLC e HPSEC

Os perfis cromatográficos foram inicialmente obtidos com gradiente exploratório de água e acetonitrila (5 a 90% do modificador orgânico em 60 min), em coluna de C18 (vide Parte Experimental, item 4.1.7.2, pág. 41). Os cromatogramas obtidos demonstraram a alta polaridade dos constituintes detectáveis no UV em 210 nm. Os perfis foram semelhantes para as frações analisadas FP, QP, B1P e B2P, sendo representado apenas o cromatograma da fração B1P, a título de ilustração (Figura 6).

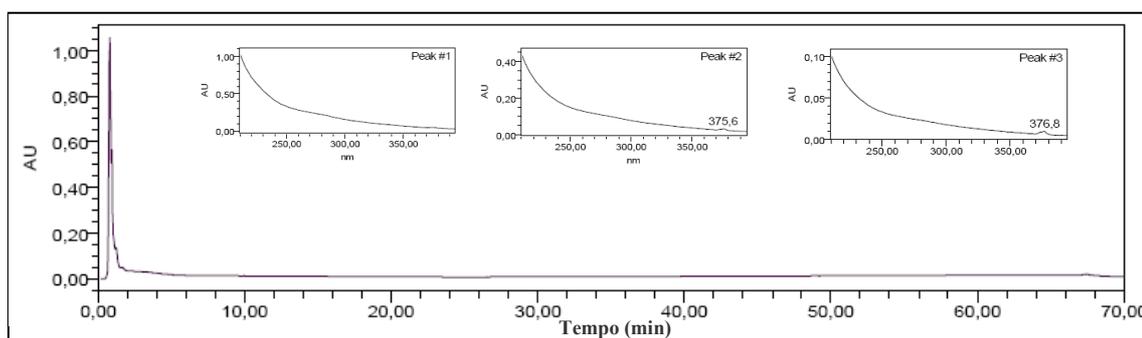


Figura 6: Cromatograma obtido por RP-HPLC para a fração B1P, oriunda da extração da alga *L. calcareum* em meio básico e precipitação dos polissacarídeos em solução hidroalcoólica. Na parte superior da figura estão representados os espectro no UV registrados *on line* pelo detector de DAD para os picos principais. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 4.1.7.2.

Os picos apresentaram tempo de retenção de no máximo 2 min. O gradiente foi então suavizado pela diminuição da inclinação, com alteração na proporção do modificador orgânico de 5 a 10 % de ACN em 45 min. Porém, não se observaram modificações significativas no tempo de retenção dos constituintes (Figura 7).

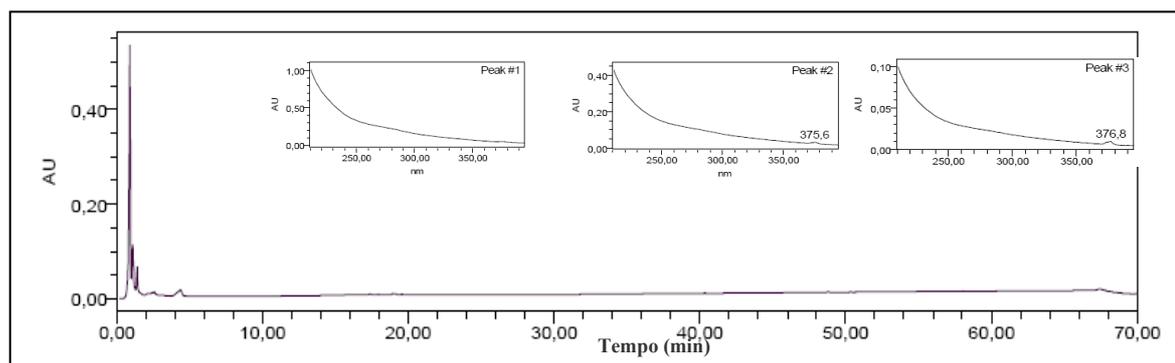


Figura 7: Cromatograma da fração B1P em coluna de C18 e eluição em gradiente de água e acetonitrila (5 a 10% do modificador orgânico em 45 min). Na parte superior da figura estão representados os espectro no UV registrados *on line* pelo detector de DAD para os picos principais.

Esses dados demonstram de maneira inequívoca a necessidade de se estabelecer outras condições cromatográficas para a análise dos polissacarídeos de *L. calcareum*, visto que os constituintes das amostras pouco interagem com a fase estacionária utilizada (coluna de ODS), inviabilizando sua análise por fase inversa.

Cromatografia de filtração molecular apresenta-se como alternativa para a separação de polissacarídeos, tendo seu emprego descrito em alguns trabalhos (MELO et al, 2002 e SHI et al, 2007). Assim, foram obtidos perfis cromatográficos por HPLC utilizando coluna Ultrahydrogel Linear (HPSEC), com capacidade para separar moléculas com massas moleculares no intervalo de 500 a 10.000.000 Da, segundo especificação do fornecedor (Waters). A eluição foi realizada com água MiliQ, resultando em cromatogramas com melhor resolução, permitindo visualizar os constituintes das frações. Os cromatogramas obtidos para as frações iniciais resultantes dos diferentes processos de extração avaliados para *L. calcareum* estão representados na Figura 8.

Os perfis das frações de polissacarídeos resultantes das diversas extrações apresentaram reduzida complexidade. O cromatograma da fração FP é constituído por um pico majoritário com tempo de retenção (TR) de aproximadamente 15 min, correspondente ao pico com maior TR em relação aos demais cromatogramas. Portanto, este pico corresponde ao polissacarídeo de menor massa molecular. As frações B1P e B2P, resultantes das extrações básicas, apresentaram perfis semelhantes, com predomínio de picos largos com tempo de retenção entre 8 e 13 min. Pode-se observar que polissacarídeos de maior massa molecular (menor tempo de retenção) foram extraídos em meio básico (B1P e B2P), em relação à extração aquosa conduzida à temperatura ambiente (FP). Assim, o polissacarídeo de menor massa molecular foi extraído em meio aquoso (FP), sem aquecimento e em pH neutro. A grande

semelhança das frações oriundas das extrações básicas possibilita concluir que o aumento da concentração de Na_2CO_3 é pouco seletivo na extração desses polissacarídeos. O perfil encontrado para a extração a quente (QP), em pH neutro, foi aparentemente o de maior complexidade.

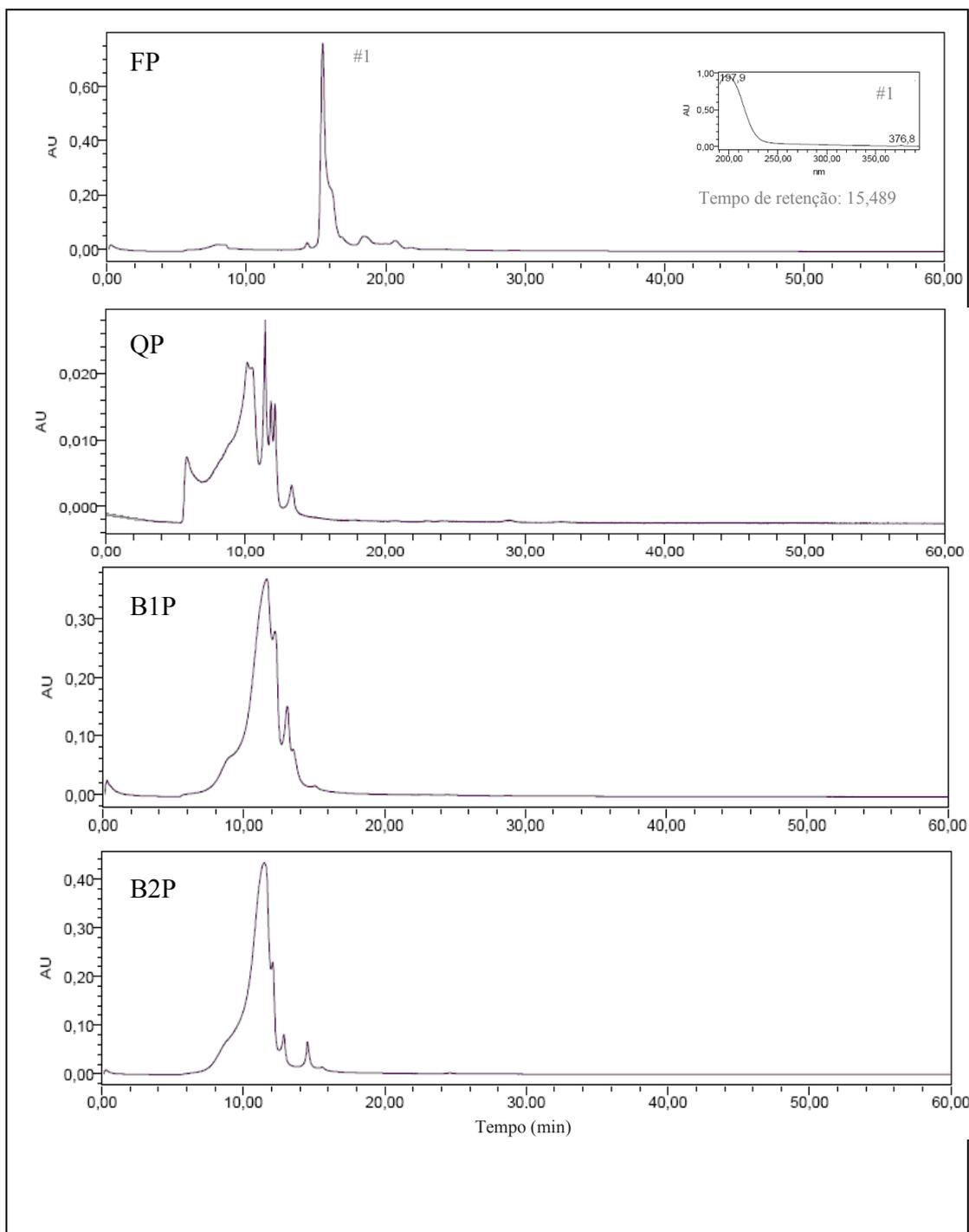


Figura 8: Cromatogramas obtidos por HPSEC-UV para as frações FP, QP, B1P e B2P. Condições cromatográficas: coluna Ultrahydrogel Linear com eluição isocrática de água MiliQ, fluxo de 0,6mL/min, à temperatura ambiente e detecção no $\text{UV}_{210\text{nm}}$. No cromatograma de FP apresenta-se o espectro no UV registrado *on-line* para o pico majoritário destacado e seu tempo de retenção. FP: extração a temperatura ambiente, QP: a quente, B1P: em meio básico (1% Na_2CO_3) e B2P em meio básico (2% Na_2CO_3).

As frações foram analisadas por técnicas espectrométricas, visando à caracterização estrutural, sendo submetidas posteriormente a refracionamento. A fração QP não foi refracionada devido à pequena massa disponível e grande complexidade demonstrada no cromatograma da Figura 8.

5.3 Caracterização estrutural dos polissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas de difícil elucidação estrutural devido sua complexidade química, resultante da diversidade de ligações e grupos substituintes. Dessa forma, é usual proceder à caracterização química de polissacarídeos a partir da quantificação do teor dos monossacarídeos constituintes, bem como determinar as concentrações de sulfato, ácido urônico e proteínas que compõem a molécula. Essas informações são relevantes também do ponto de vista biológico, pois muitas vezes a atividade farmacológica está relacionada ao teor de substituintes como sulfato e à massa molecular do polímero (BERTEAU, 2003).

5.3.1 Espectroscopia no UV/VIS e reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico

A fim de caracterizar os polissacarídeos presentes nas frações obtidas nas diferentes condições extrativas foram realizadas análises espectroscópicas no UV/VIS, pela reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico. Açúcares simples, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados, com grupo redutor livre ou potencialmente livre, resultam em compostos com coloração amarela ou alaranjada quando tratados com fenol e ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

A técnica colorimétrica baseada na reação com fenol em ácido sulfúrico é amplamente usada para a detecção e quantificação de carboidratos, produzindo derivados com cromóforos distintos para pentoses e hexoses, que têm máximos de absorção em 480 e 490 nm, respectivamente.

Muitos testes dessa natureza baseiam-se na forte coloração gerada por produtos de degradação ácida e compostos poliaromáticos (FERRIER & COLLINS, 1972); porém, a estrutura química dos derivados formados permanece desconhecida. Desta forma, propõe-se para a reação o mecanismo representado na Figura 9 e Figura 10.

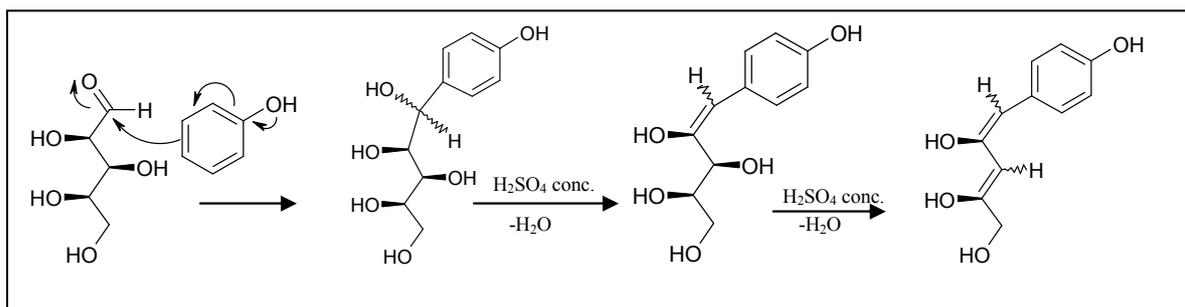


Figura 9: Proposta de mecanismo químico da reação colorimétrica de fenol- ácido sulfúrico para pentoses (xilose).

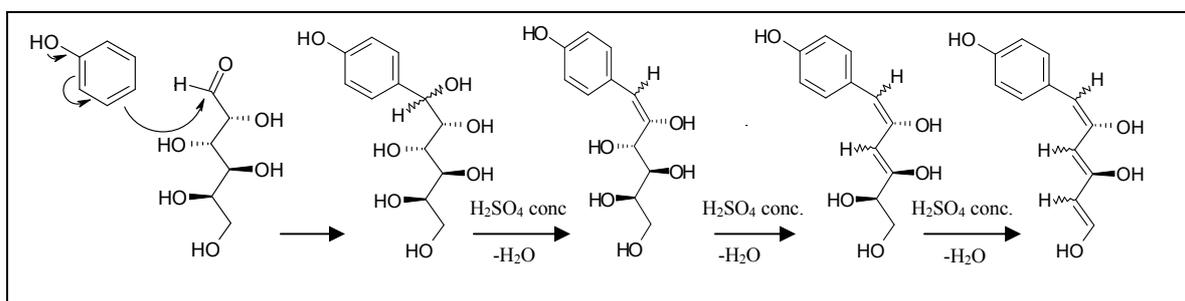


Figura 10: Proposta de mecanismo da reação fenol-ácido sulfúrico para hexoses (galactose).

Em meio ácido, pode ocorrer o ataque nucleofílico dos elétrons do anel aromático à carbonila aldeídica ou cetônica do carboidrato. Após a reação de adição, sucessivas desidratações ocorrem pela perda das hidroxilas do carboidrato em meio de ácido sulfúrico concentrado. A conjugação das ligações duplas, juntamente com a porção aromática, fornece cromóforos distintos para pentoses e hexoses.

O mecanismo proposto baseia-se na diferença desses cromóforos, resultante da extensão da ressonância pelas ligações duplas adjacentes, sendo portanto dependente do número de carbonos. É sabido que a ocorrência de uma banda com máximo de absorção em 480 nm indica a presença de pentoses (ou ácido urônico), enquanto o máximo de absorção em 490 nm é característico de hexoses (DUBOIS et al, 1956). Essa análise, porém, é demasiadamente simplista em se tratando de misturas complexas como frações de polissacarídeos.

Diversas outras reações podem ocorrer, incluindo a formação de cromóforos como furaldeídos (FERRIER & COLLINS, 1972) que podem interferir nas análises. Sendo assim, o experimento fornece uma estimativa aproximada do teor de carboidratos presentes na amostra.

Os espectros registrados no UV-VIS para as frações FP, QP, B1P e B2P, após reação com fenol-ácido sulfúrico, foram idênticos, estando representado, a título de ilustração, o espectro da fração B1P (Figura 11).

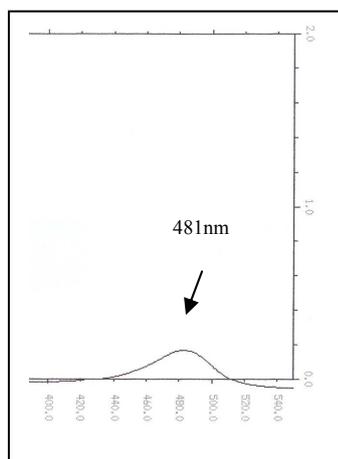


Figura 11: Espectro no UV/VIS obtido para a fração B1P (0,33 g/L), após reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico.

O máximo de absorvância observado foi em torno de 481 nm, ocorrendo pequenas variações nos valores entre as frações quantificadas, inferiores a 2 nm. Esses dados sugerem que pentoses ou ácido urônico sejam constituintes dos polissacarídeos de *L. calcareum*. Esses resultados são condizentes com a composição química já relatada para outras espécies da ordem Corallinales, que indicam a presença de resíduos de xilose (BILAN & USOV, 2001).

5.3.2 Espectroscopia no infravermelho

A fim de confirmar a natureza polissacarídica dos precipitados obtidos, foram realizadas análises espectroscópicas no infravermelho (IV).

De maneira geral, os espectros no IV obtidos para as frações FP, QP, B1P e B2P apresentaram sinais de vibração e rotação com frequências e intensidades semelhantes (Figura 12 a Figura 15). Assim, a banda intensa e larga em torno de 3281 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento O-H de alcoóis em interações poliméricas. A confirmação da presença de alcoóis foi fornecida pela banda intensa na região de 1070 cm^{-1} , atribuída à deformação axial de C-O.

A banda na região de 3280 cm^{-1} também pode ser atribuída a estiramento O-H de ácido carboxílico, o que indicaria a presença de ácido urônico nas frações polissacarídicas em análise. A presença de ácido carboxílico foi confirmada pela banda intensa de deformação

axial assimétrica de carbonila de íon carboxilato nos espectros, na região de 1630 a 1560 cm^{-1} , bem como pelo sinal fraco próximo a 1400 cm^{-1} , atribuído à deformação axial simétrica, também de C=O de íon carboxilato. A banda fraca em torno de 2930 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C-H.

Banda de intensidade variável próxima a 1040 cm^{-1} e banda forte em 650 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos axiais simétricos e assimétricos de SO_2 e de ácido sulfônico, respectivamente. Ambas são observadas em todos os espectros, indicando assim a presença de polissacarídeos sulfatados.

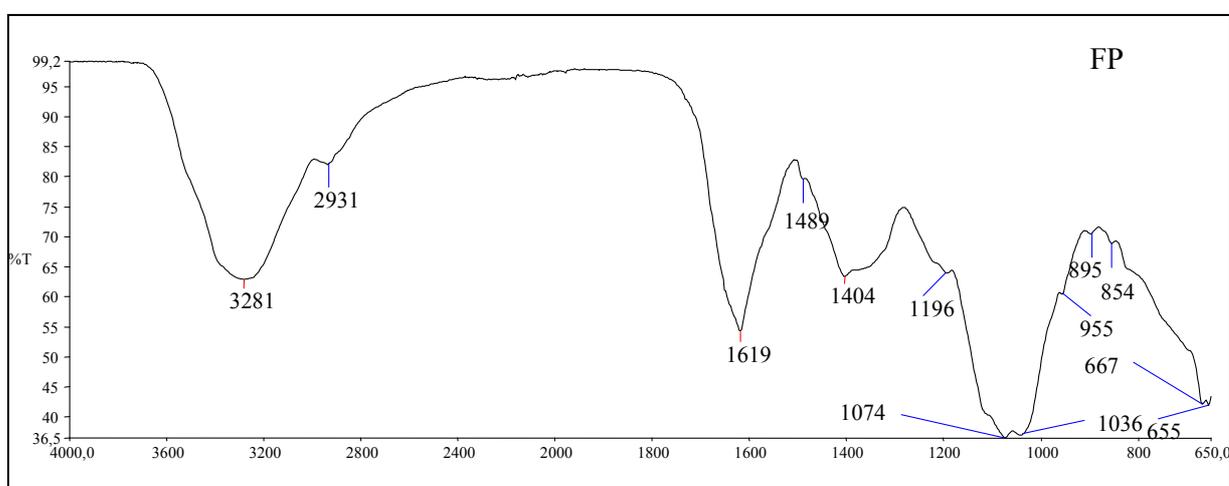


Figura 12: Espectro no infravermelho da fração FP.

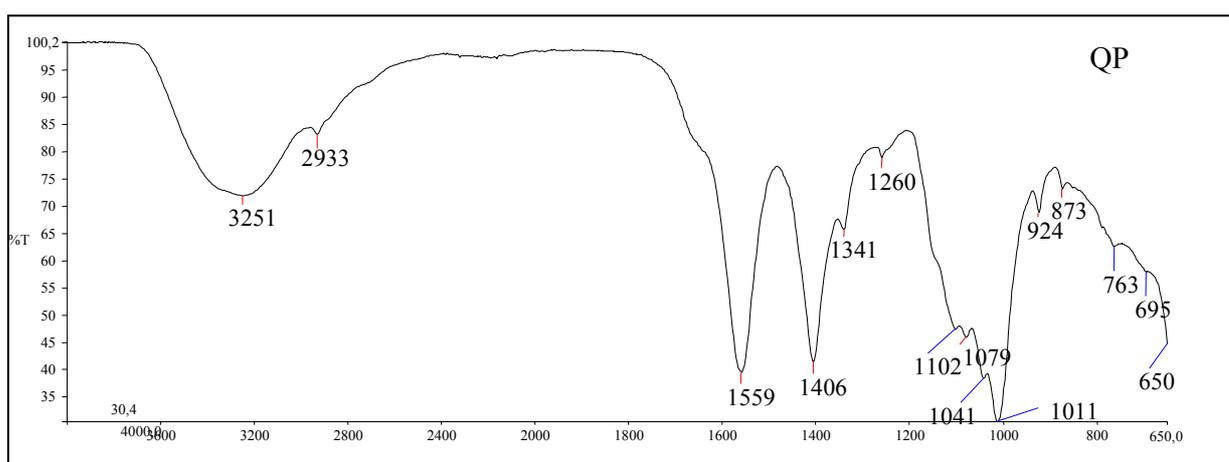


Figura 13: Espectro no infravermelho da fração QP.

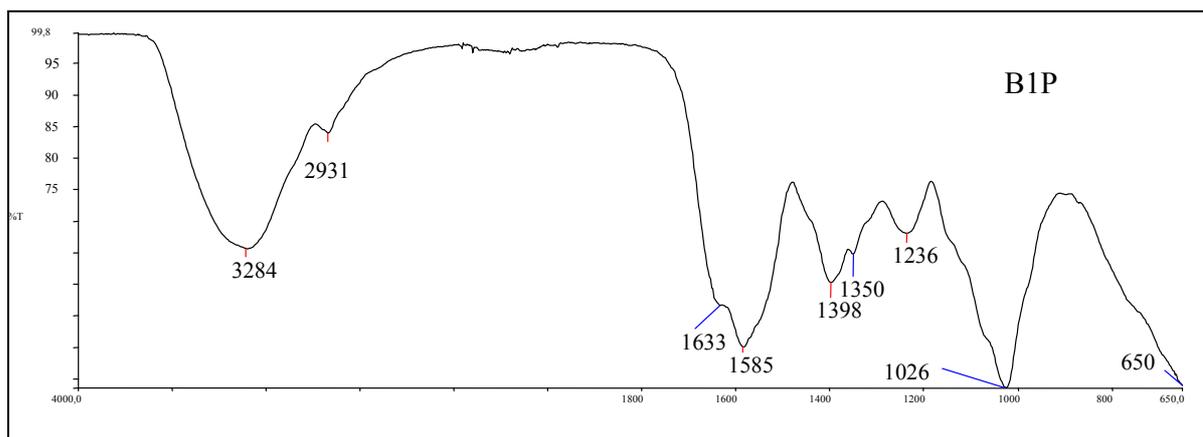


Figura 14: Espectro no infravermelho da fração B1P.

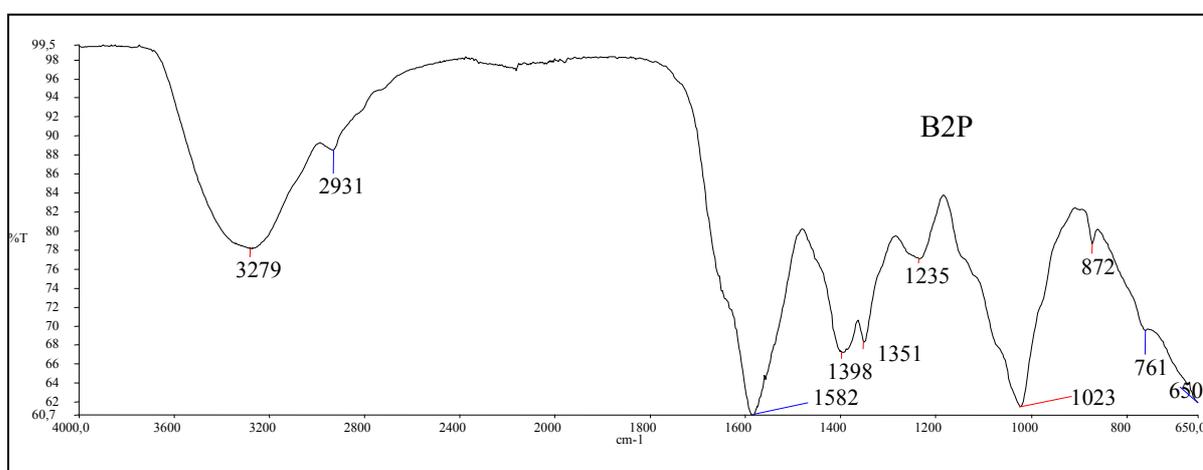


Figura 15: Espectro no infravermelho da fração B2P.

5.3.3 Açúcares totais

A técnica inicialmente empregada para a quantificação de açúcares totais foi o ensaio padronizado por Masuko e colaboradores (2005). As leituras de absorbância encontradas para as soluções referência de galactose foram três vezes menores que os valores relatados pelos autores, empregando as mesmas concentrações. Além disso, a curva de calibração obtida para a galactose não apresentou linearidade satisfatória na faixa de concentrações ensaiadas (item 4.2.2.3), gerando coeficientes de determinação (r^2) inferiores a 0,8. Mesmo após diversas repetições do método, inclusive com lotes distintos de reagentes, o experimento não se mostrou reprodutível nem linear nas faixas de concentração trabalhadas. Dessa forma, essa reação foi utilizada somente para detecção qualitativa dos polissacarídeos, para monitorar os fracionamentos cromatográficos.

Assim, para determinar o teor de açúcares totais foi utilizado o método desenvolvido por Dubois e colaboradores (1956), executado em tubos de ensaio e com leitura em espectrofotômetro no UV-VIS (item 4.2.2.1).

O método apresentou linearidade satisfatória ($r^2 = 0,97$) na faixa de concentrações de 0,1 a 1,0 mg/mL (Figura 16) e a equação da reta obtida ($y = 2,96 x + 0,16$) foi utilizada para cálculo da porcentagem de açúcares totais. Os teores de açúcares totais quantificados para as diferentes frações de *L. calcareum* estão representados na Tabela 7.

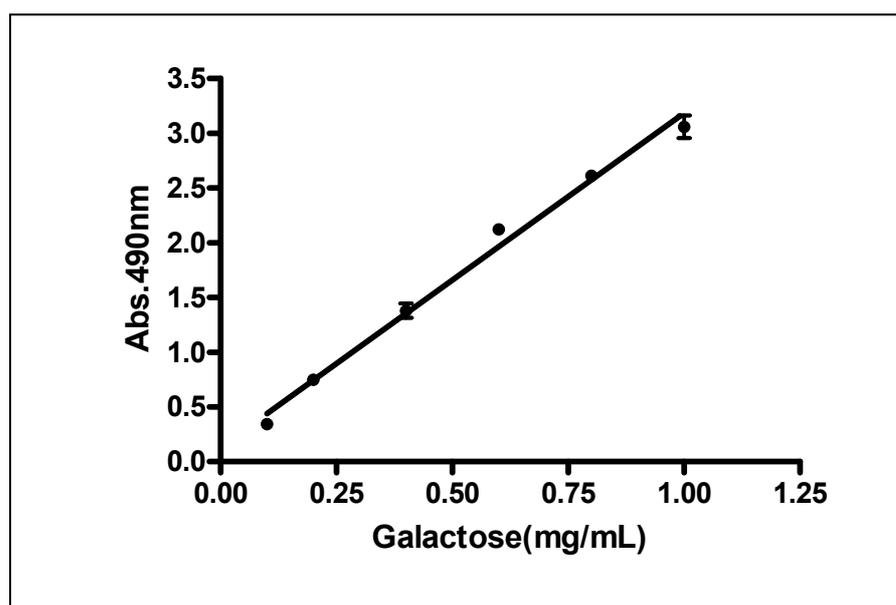


Figura 16: Curva de calibração empregada para a quantificação de açúcares totais, obtida pela reação colorimétrica de fenol-ácido sulfúrico com galactose.

Tabela 7: Teores percentuais de açúcares totais em frações polissacarídicas de *L. calcareum*.

Fração	Açúcares totais (% \pm d.p, $n= 3$)
FP	48,0 \pm 1,0
QP	51,5 \pm 2,0
B1P	40,0 \pm 1,0
B2P	38,8 \pm 0,9

Cabe ressaltar que a escolha da galactose como substância de referência deveu-se à sua grande ocorrência em polissacarídeos de espécies da ordem Corallinales, principalmente na cadeia principal (BILAN & USOV, 2001).

5.3.4 Quantificação de sulfato

A fim de determinar o grau de sulfatação dos polissacarídeos constituintes de *L. calcareum*, procedeu-se à quantificação do teor de sulfato nas frações pelo método de Dodgson & Price (1962). O método baseia-se na hidrólise do grupo sulfato em meio ácido, com a liberação de ácido sulfúrico, que é quantificado por turbidimetria, após precipitação com sulfato de bário (Figura 17).

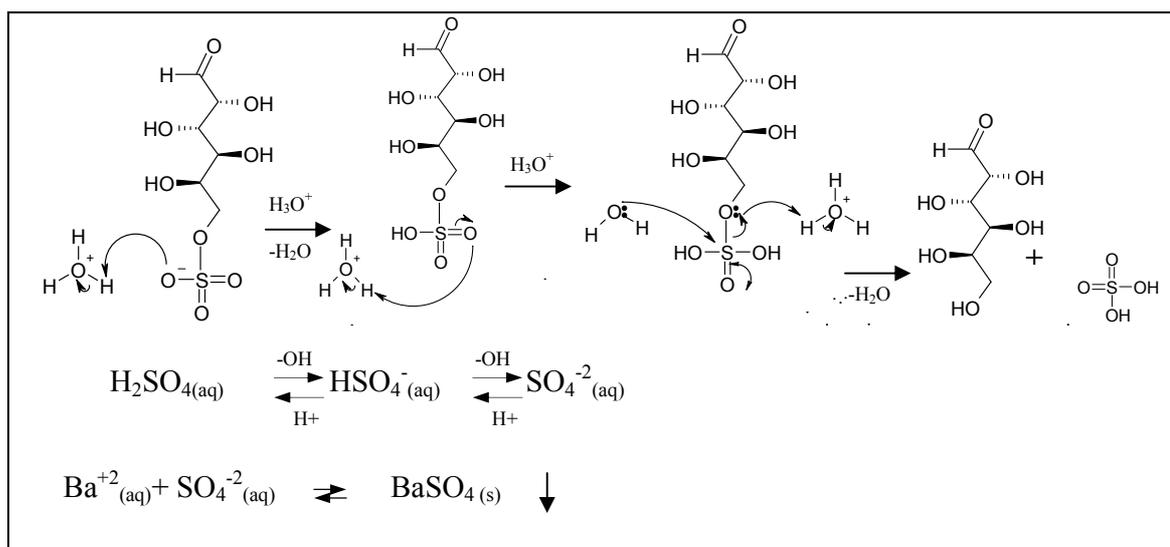


Figura 17: Fundamento químico da reação de quantificação de sulfato em polissacarídeos por turbidimetria.

À medida que o precipitado de sulfato de bário (BaSO_4) é formado, o equilíbrio químico da reação ácido-base é deslocado na direção da base conjugada.

O sulfato de potássio foi utilizado como substância de referência para a construção da curva de calibração. Foram obtidas 3 curvas em dias distintos, as quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), sendo os dados reunidos em uma única curva, representada na Figura 18. A curva apresentou linearidade satisfatória ($r^2 = 0,97$) e a equação da reta obtida ($y = 0,24x + 0,004$) foi utilizada para quantificação de sulfato nas diferentes amostras. Os teores de sulfato determinados para as frações polissacarídicas de *L. calcareum* estão relatados na Tabela 7.

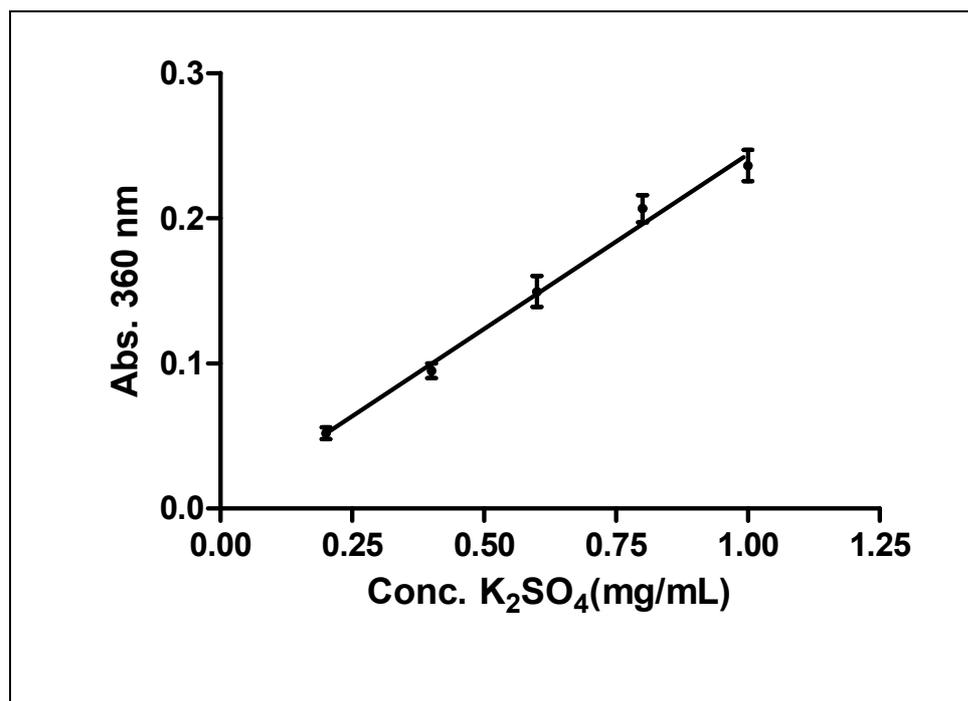


Figura 18: Curva de calibração para quantificação de sulfato pelo método turbidimétrico (DODGSON e PRICE, 1962)

Tabela 8: Teor médio de sulfato nas frações de polissacarídeos de *L. calcareum*.

<i>Fração</i>	<i>Teor de sulfato</i> (% ± d.p., n = 3)
FP	37 ± 5
QP	15 ± 1
B1P	3,6 ± 0,9
B2P	18 ± 1

Teor percentual de sulfato de aproximadamente 7 % foi relatado para as algas calcárias *Corallina officinalis*, *Bossiella orbigniana* e *Jania rubens* (NAVARRO & STORTZ, 2002). Outra espécie, *Corallina pilulifera*, apresentou polissacarídeos com teores de sulfato variando de 1 a 29 % (USOV et al, 1997).

O grupo sulfato confere maior polaridade aos polissacarídeos tornando-os mais solúveis em meio aquoso. A fração FP foi obtida em meio aquoso à temperatura ambiente (item 4.1.2.2), extraíndo, portanto, os polissacarídeos mais solúveis e com maior grau de sulfatação. A extração aquosa à quente (QP) resultou em polissacarídeos com teor inferior à extração à temperatura ambiente. A fração B1P obtida pela extração com solução de Na₂CO₃ a 1%

apresentou baixo teor de sulfato; porém, na fração obtida com maior concentração da base (B2P, solução de Na₂CO₃ a 2%) observou-se um teor maior desse grupo.

Os resultados obtidos demonstram inequivocamente a presença de sulfato nas amostras, após hidrólise dos polissacarídeos, corroborando as informações obtidas nos espectros de infravermelho. A quantificação do teor de sulfato em polissacarídeos é um parâmetro importante para sua caracterização química, bem como a determinação de posição dos grupos sulfato na estrutura da molécula, pois ambas as características estão intimamente associadas com a atividade biológica de inibição do rolamento de leucócitos (BERTEAU & MULLOY, 2003).

5.3.5 Quantificação de ácido urônico

A determinação do teor de ácido urônico nas frações de polissacarídeos de *L. calcareum* foi realizada segundo o método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), utilizando ácido glicurônico como substância de referência. O método de detecção, por reação com *m*-hidroxidifenil e adição de sulfamato, foi utilizado por ser o menos susceptível a interferências, segundo os autores citados.

No presente trabalho propõe-se um mecanismo para a reação, já que esse não foi encontrado nas fontes pesquisadas (FILLISETTI-COZZI & CARPITA, 1991; BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, 1973; GALAMBOS, 1967; KNUTSON & JEANES, 1968). A proposta é baseada na reação da *m*-hidroxidifenil com o ácido urônico em meio ácido, a partir do ataque nucleofílico ao carbono da carboxila, levando à formação de cromóforo, pelas sucessivas desidratações induzidas pelo H₂SO₄ concentrado, gerando um produto de coloração rosa. Na Figura 19 está representada a proposta de mecanismo para esta reação química. A coloração é descrita como estável por até 1 hora, observando-se redução após esse tempo (FILISETTI-COZZI & CARPITA, 1991).

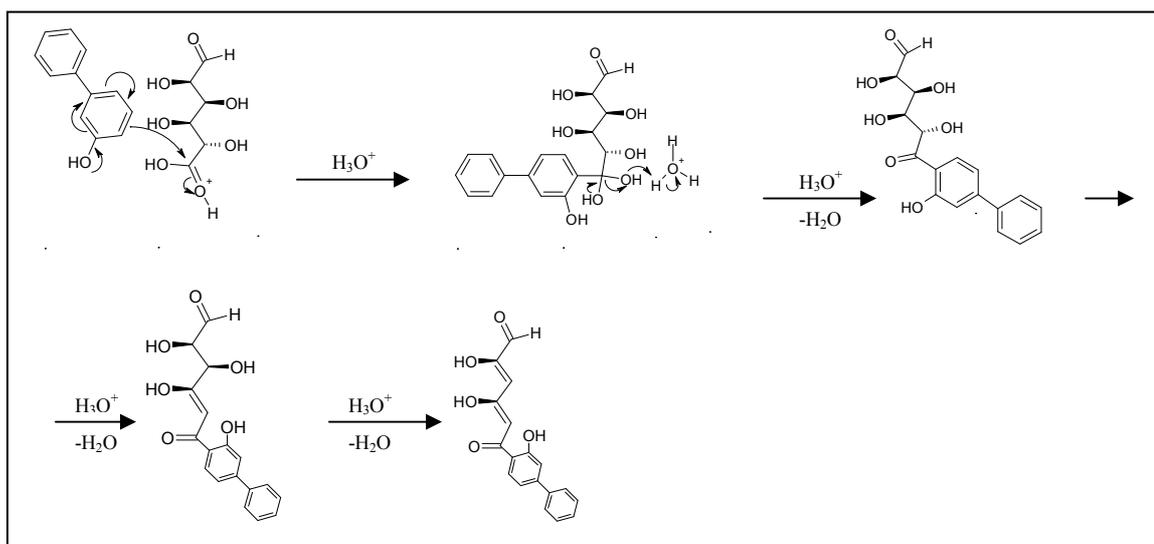


Figura 19: Proposta de mecanismo para a reação de quantificação de ácido urônico pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

A adição da solução de sulfamato, anteriormente ao aquecimento, foi utilizada para minimizar a interferência de açúcares neutros, de acordo com recomendação de Galambos (1967); porém, o fundamento químico desse procedimento não foi relatado pelo autor.

Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) recomendam realizar a reação em tubos contendo pérolas de vidro (*capped with marbles*) para evitar turvação pela precipitação de sais (provavelmente do sulfamato), que podem interferir nas leituras espectrofotométricas. Assim, após resfriamento, quando houve aparecimento de precipitado ou turvação, a suspensão foi centrifugada para evitar essa interferência.

O método é descrito pelos autores como sendo linear na faixa entre 5 e 200 nmol de ácido urônico, que corresponde às concentrações de soluções de referência de ácido glicurônico de 0,0024 a 0,0970 mg/mL. Essa faixa de concentrações foi adotada nesse trabalho.

A equação da reta obtida para a curva de calibração foi $y = 4,9x - 0,033$, com coeficiente de determinação $r^2 = 0,984$ (Figura 20), sendo utilizada para quantificação de ácido urônico nas diferentes amostras. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os resultados expressos como média percentual seguida de desvio-padrão (Tabela 8).

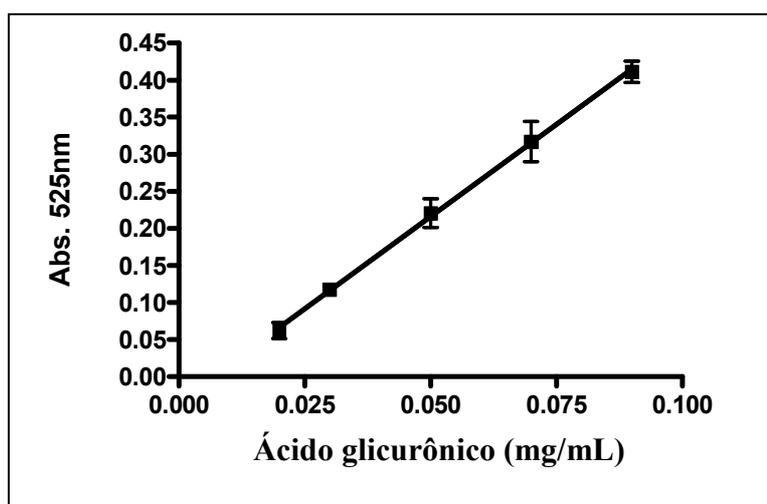


Figura 20: Curva de calibração para quantificação de ácido urônico pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita, empregando ácido glicurônico como substância de referência.

Tabela 9: Teor de ácido urônico nas frações de polissacarídeos de *L. calcareum*.

Fração	Ácido urônico (%± d.p., n=3)
FP	1,7 ± 0,1
QP	1,1 ± 0,4
B1P	4,5 ± 0,1
B2P	4,6 ± 0,1

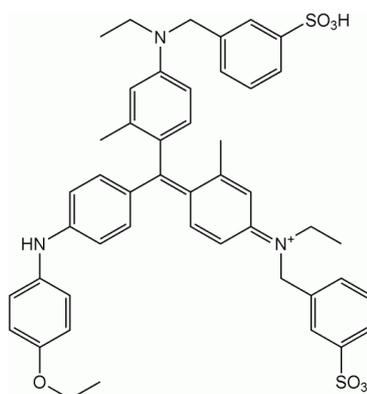
A reação utilizada está sujeita a interferências como o elevado teor de açúcares neutros (superior a 10 vezes a concentração de ácido urônico), bem como a formação de produtos diversos pela reação com outros constituintes da amostra, de natureza não polissacarídica. Sendo assim, o método fornece um valor estimado do teor de ácido urônico nas amostras.

As extrações em meio básico (B1P e B2P) resultaram em frações com maior teor de ácido urônico. A alcalinização do meio provavelmente resultou em ionização de grupos ácidos, aumentando a solubilidade de polissacarídeos que contêm, por exemplo, ácido algínico ou resíduos de ácido galacturônico e/ou glicurônico. O teor de ácido urônico de aproximadamente 4 % é compatível com o relatado para xilogalactanas sulfatadas presentes nas algas *Corallina officinalis*, *Bossiella orbigniana* e *Jania rubens* da ordem Corallinales (NAVARRO & STORTZ, 2002).

5.3.6 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas é um parâmetro relevante para a caracterização de polissacarídeos, pois frequentemente estes ocorrem ligados a proteínas, sendo a quantificação essencial para o conhecimento estrutural.

O fundamento químico do método de quantificação utilizado no presente trabalho é a reação da parcela protéica do polímero com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (16) (BRANDFORD, 1976). Porém, o autor não fornece nenhuma informação sobre a natureza do produto formado, exceto que o complexo proteína-Coomassie é estável por até 1 hora.



(16)

Para a quantificação de proteínas foram construídas três curvas de calibração em dias distintos, empregando-se albumina sérica bovina como substância de referência. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre elas por análise de covariância ($p > 0,05$) e os dados obtidos foram utilizados para a construção de uma única curva, empregada nas quantificações, obtendo-se a equação $y = 0,69x - 0,04$ e valor de coeficiente de determinação $r^2 = 0,98$.

Os teores de proteínas determinados para as frações polissacarídicas de *L. calcareum* estão listados na Tabela 9.

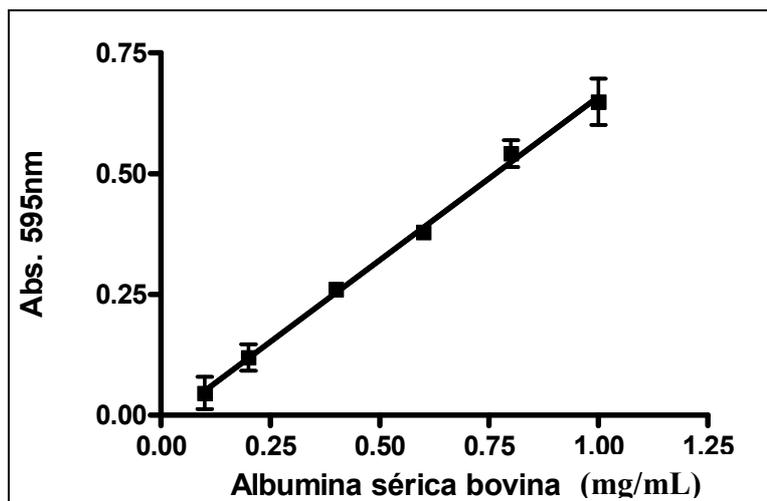


Figura 21: Curva de calibração para quantificação espectrofotométrica de proteínas totais pelo método de Bradford, empregando-se albumina sérica bovina como substância de referência e detecção em 595 nm.

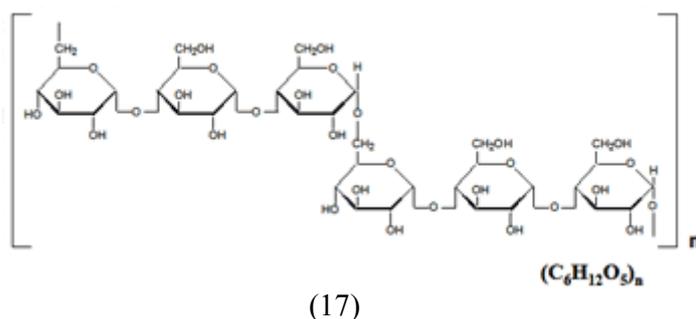
Tabela 10: Teor de proteínas nas frações de polissacarídeos de *L. calcareum*.

Fração	Proteínas (%± d.p., n=3)
FP	3,9 ± 0,6
QP	1,0 ± 2,0
B1P	6,0 ± 1,0
B2P	2,3 ± 0,1

Os polissacarídeos isolados das espécies calcárias *Corallina officinalis*, *Bossiella orbigniana* e *Jania rubens* apresentam teores de proteínas consideravelmente superiores, na faixa de 6 a 30 %, variável em função do método de extração utilizado (NAVARRO & STORTZ, 2002).

5.3.7 Determinação da massa molecular

A massa molecular dos polissacarídeos isolados foi estimada por filtração molecular em cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho (HPSEC), a partir da comparação com padrões de pululana (17), de diferentes massas moleculares. As pululanas são polissacarídeos lineares constituídos por subunidades de maltotriose. Devido à ausência de cromóforos, usualmente emprega-se detector de índice de refração para análise dessas moléculas, sem necessidade de derivação.



Uma relação linear pode ser estabelecida entre a massa molecular dos padrões de pululana e o tempo de retenção por HPSEC, sendo que quanto maior o tempo de retenção, menor a massa molecular. Assim, para construção da curva de calibração, os tempos de retenção (Tr) obtidos pelas injeções em triplicata de 8 padrões de pululana de diferentes massas moleculares (Tabela 2) foram plotados *versus* o logaritmo das massas moleculares (MM). O coeficiente de determinação (r^2) obtido para a reta foi de 0,9982, indicando linearidade satisfatória do método. A equação da reta obtida a partir da análise de regressão linear dos dados ($y = -2,79x + 31,6$; $x = \log MM$) foi utilizada para determinar a massa molecular dos polissacarídeos isolados de *L. calcareum*.

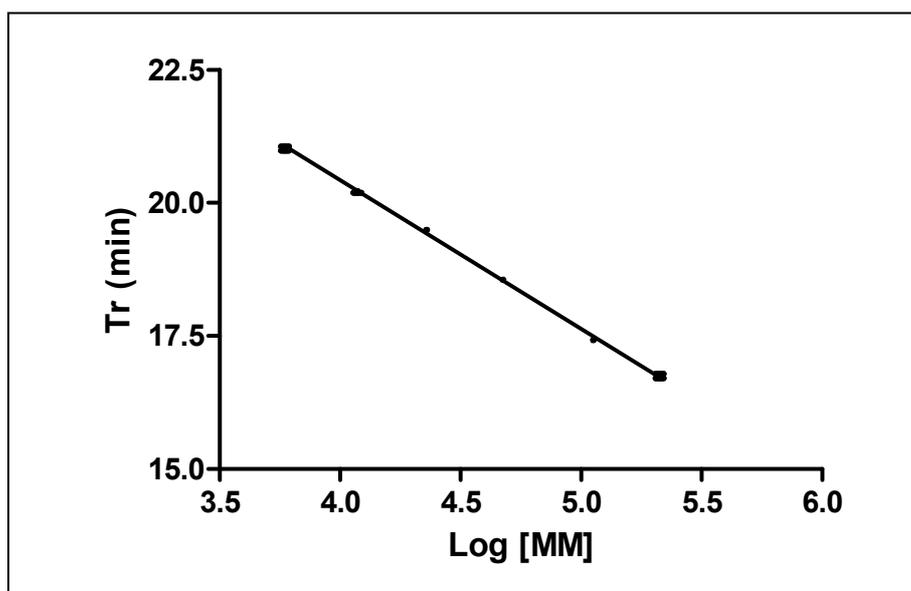


Figura 22: Curva de calibração obtida a partir da análise de padrões de pululanas de massas moleculares distintas por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho (HPSEC) (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.8.7).

A determinação da massa molecular foi realizada para os polissacarídeos isolados de *L. calcareum* e os resultados são apresentados juntamente com as demais caracterizações realizadas para as substâncias isoladas nos itens 4.1.9.1, 4.1.9.2 e 4.1.9.3.

5.4 Fracionamento e caracterização estrutural das frações resultantes / polissacarídeos isolados

Diversos métodos cromatográficos foram empregados para o fracionamento dos polissacarídeos de *L. calcareum*, descritos a seguir. Cabe ressaltar a dificuldade em se trabalhar com polissacarídeos, devido à polaridade elevada dessas substâncias, sendo necessário o emprego de técnicas especiais para a secagem das amostras aquosas, a fim de evitar contaminação microbiana ou degradação por temperatura elevada. Outro fator limitante já citado foi o baixo rendimento das extrações, resultando em pequenas massas disponíveis para os fracionamentos posteriores. Além disso, a presença de altas concentrações de cloreto de sódio nas amostras constituiu uma dificuldade adicional para o trabalho, sendo necessário submeter o material a diálises exaustivas, que muitas vezes resultaram em perda de massa.

A seguir, serão apresentados os fracionamentos realizados, a caracterização estrutural dos polissacarídeos isolados e a avaliação da atividade inibitória de rolamento de leucócitos.

5.4.1 Fracionamento de FP

5.4.1.1 Cromatografia em coluna aberta de troca iônica (Sephacrose Fast Flow)

O perfil de eluição da fração FP submetida à cromatografia em coluna de troca iônica Sepharose Fast Flow (item 4.1.9.1) indicou a presença de 3 polissacarídeos, que diferem em relação à sua composição aniônica (Figura 25). As diferenças entre os constituintes podem ser atribuídas às posições distintas de ligação dos grupos sulfato ou ácido urônico no esqueleto das moléculas e / ou a variações nos teores desses grupos nas moléculas. Um pico de maior absorvância na porção inicial do cromatograma corresponde ao polissacarídeo de menor carga aniônica da fração devido à característica catiônica da fase estacionária.

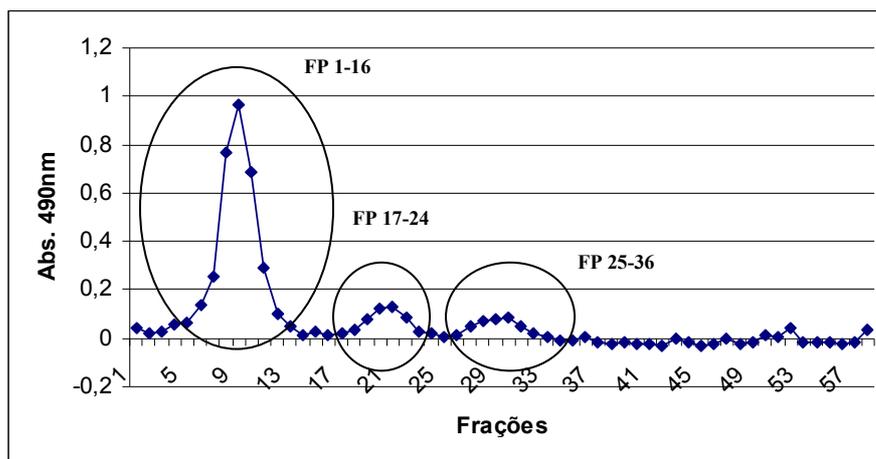


Figura 23: Cromatograma do fracionamento de FP em coluna de Sepharose Fast Flow com eluição em gradiente de NaCl e detecção em 490 nm, após reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.1.

As frações correspondentes a cada pico do cromatograma da Figura 23 foram agrupadas e dialisadas, visto que se empregou solução de NaCl como eluente. Porém, a massa recuperada na faixa de 1 a 5 mg foi insuficiente para a realização das análises estruturais. A perda de material pode ter ocorrido durante o processo cromatográfico, diálise ou secagem realizada em estufa a 60 °C. A partir desses resultados, buscou-se realizar o fracionamento por métodos cromatográficos cuja eluição é realizada apenas com água, visando eliminar a etapa de diálise após o fracionamento.

5.4.1.2 Cromatografia em coluna aberta de filtração molecular (Sephadex G-25)

Outra porção da fração FP foi submetida à cromatografia de filtração molecular em Sephadex G-25 (item 4.1.9.1), resultando no perfil representado na Figura 24. O fracionamento indica a presença de um pico majoritário, de maior massa molecular, e de uma banda larga que pode corresponder a um ou mais polissacarídeos de menor massa. Ao se analisar o perfil de eluição da Figura 23, obtido pelo fracionamento em coluna de troca iônica, pode-se concluir que o pico de maior absorção na Figura 24 é também o de maior massa molecular e de menor teor de grupos aniônicos.

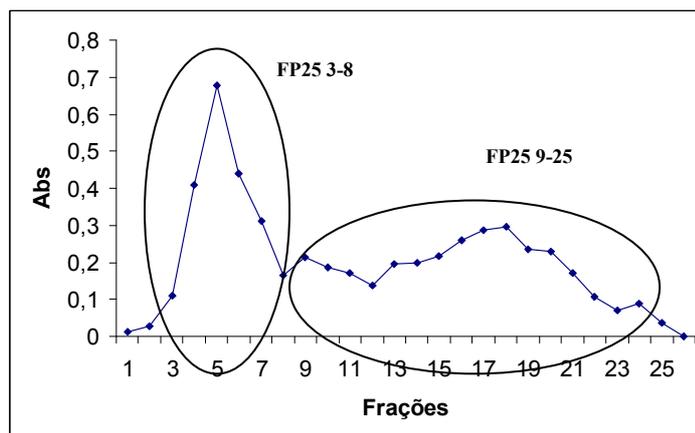


Figura 24: Cromatograma do fracionamento de FP em coluna de Sephadex G-25, com eluição isocrática de água destilada e detecção em 490 nm, após reação colorimétrica com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.1.

Após o agrupamento e secagem das frações em estufa, foram obtidas pequenas massas (4 e 5 mg). A baixa recuperação impossibilitou as análises estruturais e de atividade biológica das frações.

A fração FP foi caracterizada anteriormente ao fracionamento e os dados obtidos estão dispostos na Tabela 11. A fração foi também avaliada quanto à inibição do rolamento de leucócitos em modelo utilizando microscopia intravital *in vivo* (vide item 5.5). A discussão conjunta da caracterização química dessa fração e sua atividade biológica encontra-se no item 6.

Tabela 11: Caracterização química da fração FP

Fração	Proteínas (%± d.p.,n=3)	Açúcares totais (%± d.p.,n=3)	Ácido urônico (%± d.p.,n=3)	Sulfato (%± d.p.,n=3)	Peso molecular (× 10 ⁴ Da ± d.p.,n=3)
FP	3,9 ± 0,6	48 ± 1	1,7 ± 0,1	37 ± 5	3,8 ± 0,2

5.4.2 Fracionamento de B1P

B1P foi inicialmente submetida a fracionamento por cromatografia em coluna aberta de filtração molecular em Sephadex G-100 e eluição com água destilada (item 4.1.9.2), gerando o perfil cromatográfico representado na Figura 25. O cromatograma indica a presença de uma banda com absorbância intensa, correspondente aos polissacarídeos de massa molecular

intermediária (B1P 20-31), e de uma banda larga com baixa absorbância (B1P 1-19), relativa ao constituinte de maior massa. A fração B1P 32-40 apresentou uma pequena massa de apenas 5 mg, indicando o término da eluição cromatográfica. A pequena massa obtida para essa fração impossibilitou as demais caracterizações estruturais e experimentos biológicos.

As frações e respectivas massas estão listadas na Tabela 3 (Parte Experimental, item 4.1.9.2, pág. 49). No fracionamento ocorreu uma perda de 25%, ou seja, de 130 mg do material submetido ao processo cromatográfico, 95,7 mg foram recuperadas. Isso se deve em parte a solubilização incompleta do material no volume de água utilizado, sendo o sobrenadante separado por centrifugação a 10.000 rpm por 5min, anteriormente à aplicação na coluna cromatográfica. Outro fator que pode ter aumentado a baixa recuperação é a presença de íons pequenos que não foram separados dos polissacarídeos na diálise e permaneceram na matriz polimérica.

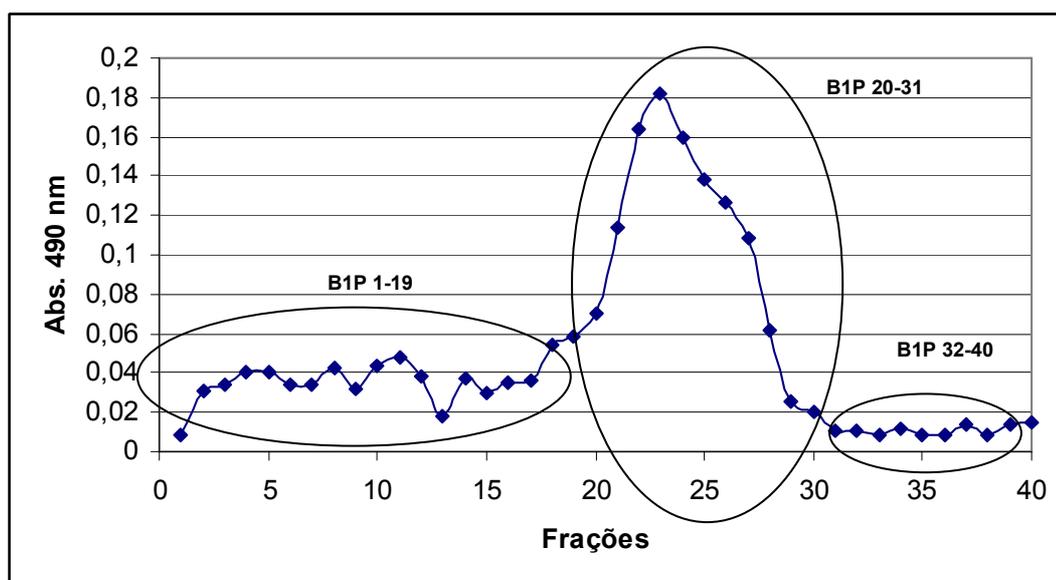


Figura 25: Primeiro fracionamento de B1P por filtração molecular em coluna de Sephadex G-100 e eluição com água destilada. Detecção no visível em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.2.

Visando separar os constituintes da fração B1P 20-31, esta foi submetida, na seqüência, à cromatografia de troca iônica em coluna aberta de Sepharose Fast Flow, eluída com soluções aquosas de NaCl de molaridade crescente. O perfil cromatográfico obtido encontra-se representado na Figura 26.

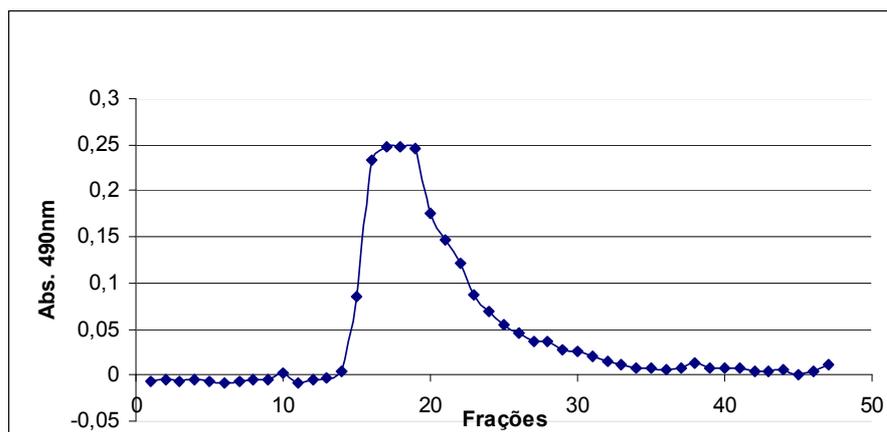


Figura 26: Fracionamento de BIP 20-31 por cromatografia de troca iônica em coluna de Sepharose Fast Flow e eluição com soluções de NaCl. Detecção em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.2.

O cromatograma obtido não indicou a separação dos constituintes. As frações foram então agrupadas em uma única fração que foi submetida à diálise (*cut off* 10.000Da). No momento da diálise, conforme já descrito (item 4.1.9.2) ocorreu o aparecimento de precipitado que foi separado por centrifugação, resultando na fração BIP 20-31FF correspondente ao sobrenadante.

Uma nova porção de BIP (130 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex G-100 e eluição com água destilada, visando obter maiores massas das frações para sua posterior caracterização. O perfil cromatográfico obtido está representado na Figura 27.

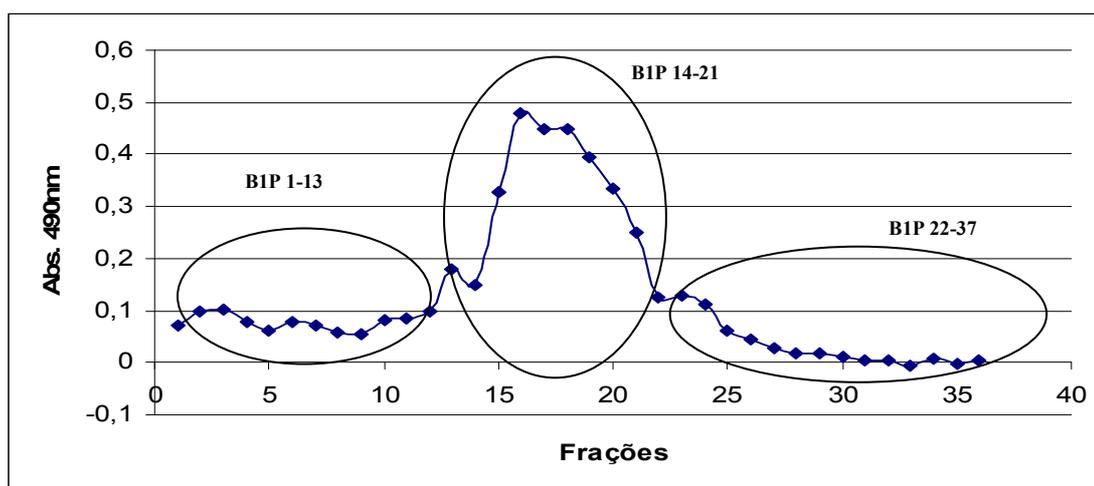


Figura 27: Segundo fracionamento de BIP por filtração molecular em coluna de Sephadex G-100 e eluição com água destilada. Detecção no visível em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental item 4.1.9.2.

A recuperação do material aplicado nesse processo cromatográfico foi de aproximadamente 84%, superior àquela do fracionamento prévio de B1P. De forma semelhante ao primeiro fracionamento de B1P (Figura 25), uma porção central do cromatograma, de massa molecular intermediária, apresentou maior absorção após reação com fenol-H₂SO₄. As semelhanças dos perfis obtidos para ambos os fracionamentos de B1P, mas não as massas recuperadas, indicam reprodutibilidade da separação e as frações resultantes foram submetidas a análises por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho (HPSEC) para visualizar sua composição.

As análises por HPSEC foram realizadas em coluna Ultrahydrogel Linear e eluição isocrática com água MiliQ e os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 28.

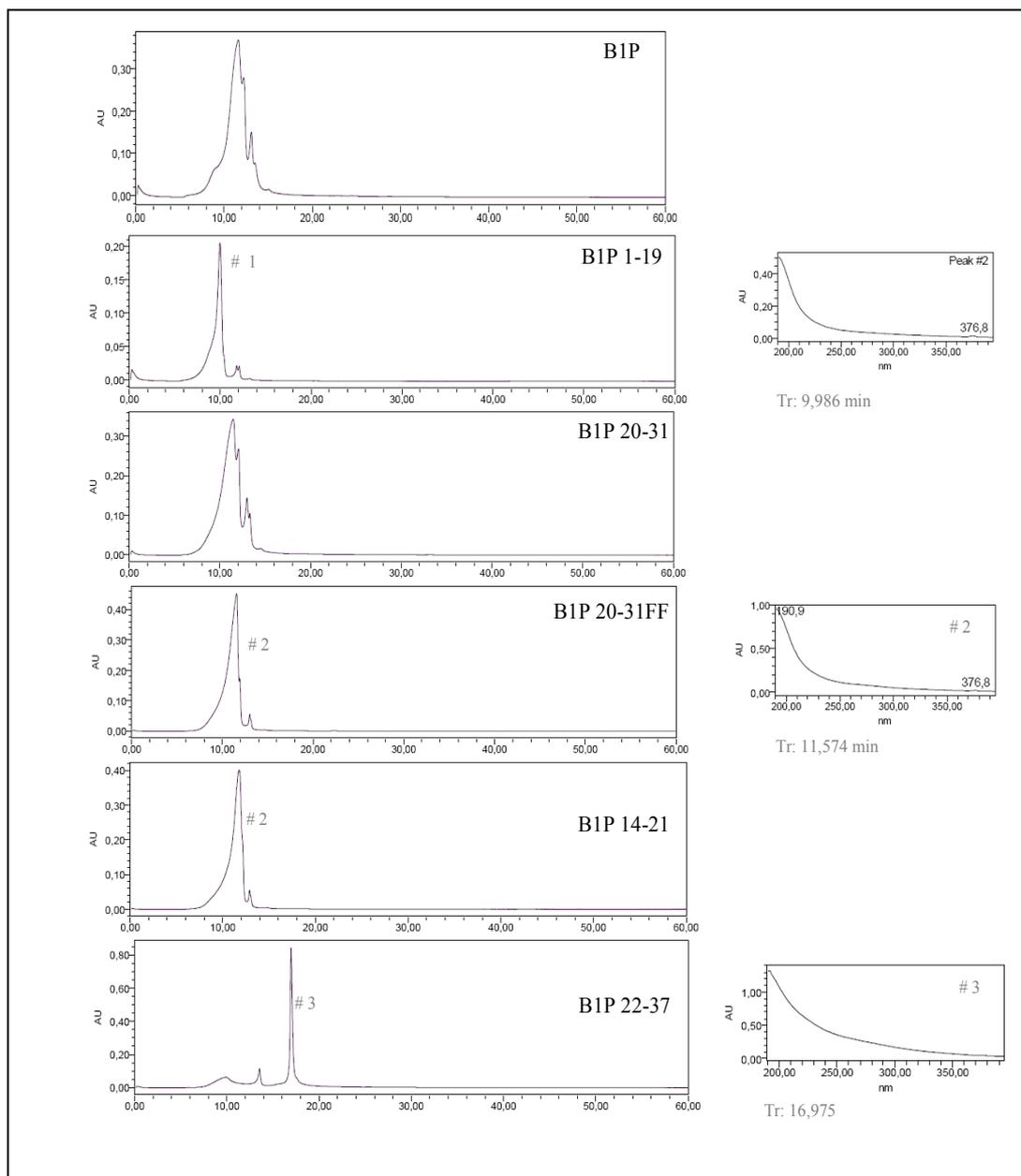


Figura 28: Cromatogramas obtidos por HPSEC-UV para BIP e para as frações oriundas deste (BIP 1-19, BIP 20-31, BIP 20-31FF, BIP14-21 e BIP 22-37).

Condições cromatográficas: coluna Ultrahydrogel Linear com eluição isocrática de água MiliQ, fluxo de 0,6mL/min, temperatura ambiente e detecção no UV em 210nm. Apresentam-se, também, os espectros no UV registrados *on-line* para os picos destacados e seus respectivos tempos de retenção (TR).

Nos cromatogramas das frações BIP 1-13 e BIP 32-37 não foram detectados picos de absorvância nos comprimentos de onda entre 210 e 400 nm, assim foram omitidos da representação da Figura 28. As frações deveriam ser analisadas por HPSEC com detecção de IR devido a ausência de cromóforos; porém, essa análise não foi realizada pela pequena

quantidade disponível (13,9 e 5 mg, respectivamente). As caracterizações estruturais foram realizadas apenas para a fração B1P 1-13.

Os cromatogramas demonstram a eficiência dos fracionamentos de B1P pelo isolamento dos três picos destacados e respectivos espectros no UV. Assim após os fracionamentos em Sephadex G-100, e posterior fracionamento em Sepharose Fast Flow (FF) para B1P 20-31, foi possível separar moléculas com diferentes tempos de retenção relativas às frações B1P 1-19 (TR ~10 min), B1P 20-31FF e 14-21 (11,6 min) e B1P 22-37 (17 min).

A separação pode ser evidenciada de forma mais eficiente por HPSEC que por perfis de eluição em coluna aberta, devido ao maior número de pratos teóricos fornecido pela técnica de alta eficiência. Outro aspecto relevante de se observar é a detecção. Os cromatogramas de HPSEC foram obtidos com detecção no UV_{210nm}, enquanto os perfis em colunas abertas foram detectados pela reação de fenol-ácido sulfúrico em microplaca. A reação colorimétrica apresenta limitações no caso de polímeros com baixo teor de monossacarídeos redutores. A utilização de detecção no UV também possui restrições, incluindo a não detecção de algumas substâncias que não apresentam grupos cromóforos. Alguns polissacarídeos, como a pululana, não absorvem no UV sendo necessário utilizar o índice de refração (RID) para sua detecção, empregado na determinação da massa molecular no presente trabalho (vide Parte Experimental, item 4.1.8.7).

Os perfis cromatográficos obtidos para as frações por HPSEC condizem com os perfis de eluição em coluna aberta. Assim, a fração B1P 1-19, correspondente à porção inicial do cromatograma da Figura 25, também possui o menor tempo de retenção em coluna Ultrahydrogel por HPSEC (Figura 28). As frações B1P 20-31FF e B1P 14-21 apresentaram um pico majoritário com tempo de retenção intermediário, próximo a 11,6 min. O pico com maior tempo de retenção foi observado na fração B1P 22-37 referente à porção final da eluição em coluna aberta (Figura 27). Todos os espectros no ultravioleta obtidos para os picos destacados nos cromatogramas (Figura 28) são condizentes com o perfil de absorção no ultravioleta de polissacarídeos.

A fim de analisar a pureza dos picos das frações B1P 1-19, B1P 20-31FF, B1P 14-21, B1P 22-35 e verificar a possibilidade de co-eluição de outras substâncias, o fluxo foi diminuído para 0,3 mL/min, valor mínimo estabelecido para o trabalho em coluna Ultrahydrogel Linear. Conforme esperado, os picos apresentaram tempos de retenção superiores aos registrados com o fluxo de 0,6 mL/min, além de alargamento da banda; porém, não houve aparecimento de novos picos sugerindo pureza dos polissacarídeos isolados (dados não apresentados).

As frações que apresentaram picos majoritários (B1P 1-19, B1P 20-31FF, B1P 14-21, B1P 22-35), indicando o isolamento de polissacarídeo, foram analisadas por espectroscopia no infravermelho para confirmar sua natureza polissacarídica. A fração B1P 1-13 foi caracterizada pelas técnicas espectrométricas apesar de não terem sido observados picos de absorção no cromatograma por HPSEC, ao se empregar detecção no UV na faixa de 210 a 400 nm (dado não demonstrado).

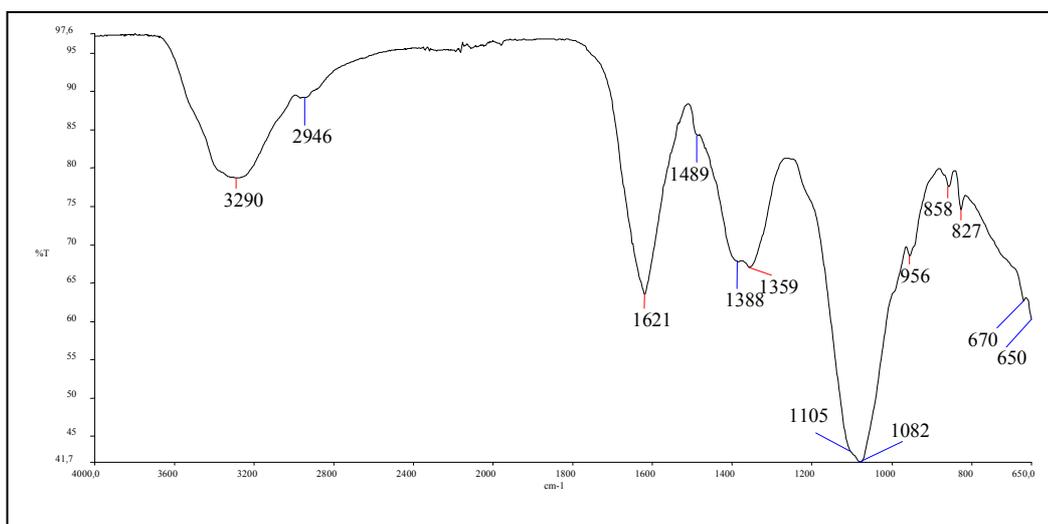


Figura 29: Espectro de infravermelho da fração B1P 1-19

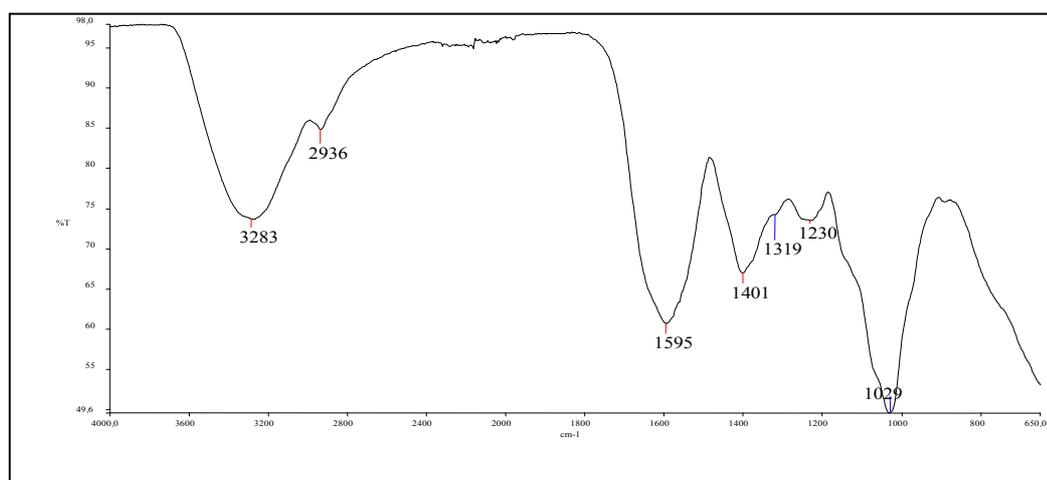


Figura 30: Espectro de infravermelho da fração B1P 20-31 FF

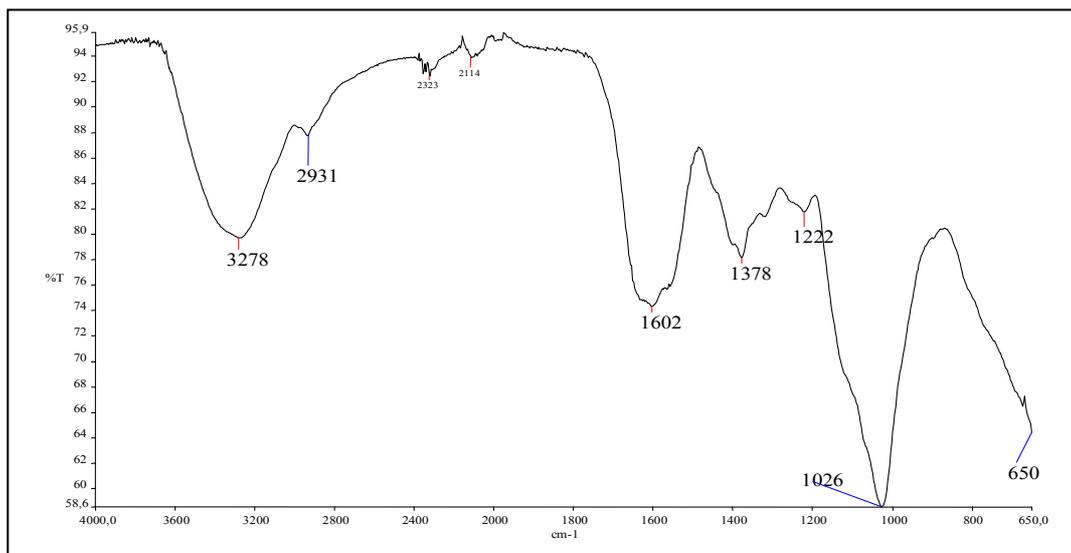


Figura 31: Espectro de infravermelho da fração B1P 1-13

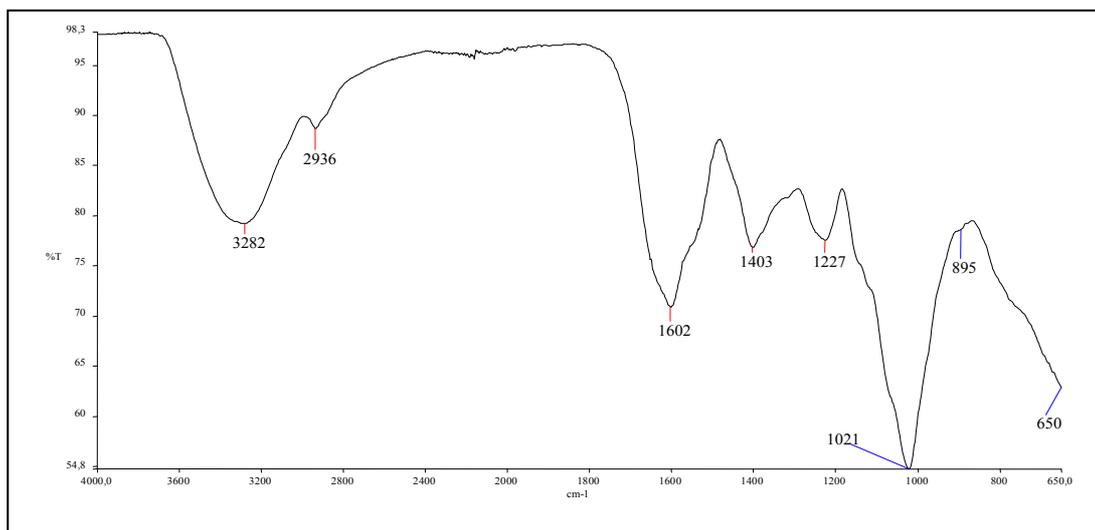


Figura 32: Espectro de infravermelho da fração B1P 14-21

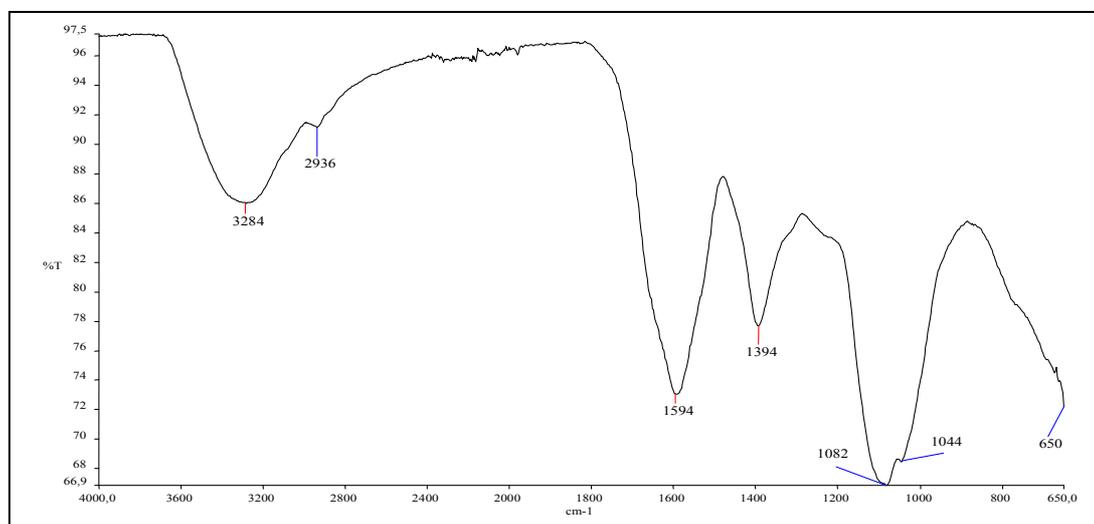


Figura 33: Espectro de infravermelho da fração B1P 22-37

Os espectros de I.V (Figura 29 a 33) apresentaram sinais característicos de carboidratos pelas bandas nas regiões de 3278, 2931 e 1026 cm^{-1} , conforme descrito no item 5.3.2. A banda larga intensa em aproximadamente 1602 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C=O de íon carboxilato, sugerindo a presença de ácido urônico. O sinal em 650 cm^{-1} foi atribuído a estiramento S=O de grupo sulfato. Essas análises indicam que as frações são compostas por polissacarídeos sulfatados.

As frações resultantes dos fracionamentos de B1P, ou seja, os polissacarídeos isolados foram caracterizados quanto aos teores de proteínas, açúcares totais, ácido urônico, sulfato e massa molecular conforme relatado na Tabela 12.

Tabela 12: Caracterização estrutural dos polissacarídeos oriundos do fracionamento de B1P.

Fração	Caracterização química (teor % \pm d.p., $n=3$)				Massa molecular (10^4 Da)
	Proteínas	Açúcares totais	Ácido urônico	Sulfato	
B1P 1-19	14 \pm 3	48 \pm 1	7 \pm 1	25 \pm 3	23 \pm 3
B1P 20-31FF	10 \pm 1	45 \pm 5	7,7 \pm 0,8	20 \pm 3	16 \pm 5
B1P 1 -13	10 \pm 4	48 \pm 3	7 \pm 1	18 \pm 2	n.d.
B1P14-21	12 \pm 4	46 \pm 5	7,4 \pm 0,3	21 \pm 1	18 \pm 5
B1P 22-37	11 \pm 3	6 \pm 1	1,4 \pm 0,1	19 \pm 3	5 \pm 1

Nota: n.d., não determinado devido à insuficiência de massa

Observa-se que a fração B1P 22-37 correspondente ao polissacarídeo de menor massa molecular apresenta teor de açúcares totais reduzido em relação as demais frações.

Segundo o padrão de caracterização estrutural adotado, as frações B1P 1-19, B1P 20-31FF e B1P 14-21 são constituídas pelo mesmo polissacarídeo, apresentando valores equivalentes para os teores de proteína, açúcares totais, ácido urônico e sulfato, bem como massas moleculares semelhante, dentro dos limites dos valores de desvio-padrão. A natureza das ligações químicas entre as unidades monossacarídicas desses compostos pode diferir, bem como as posições dos grupos substituintes; porém considerando que as frações são oriundas do mesmo material de partida (fração B1P) é bem provável tratar-se da mesma molécula.

Apesar das porcentagens de açúcares totais da fração B1P 1-19 e ser semelhantes às encontradas para as frações B1P 20-31FF e B1P 14-21, a baixa detecção na reação com fenol-

ácido sulfúrico, utilizada para monitoramento da eluição (Figura 25 e Figura 27), pode ser devido à menor concentração do polissacarídeo nessas amostras.

A fração B1P 22-37 apresentou uma reduzida concentração de carboidratos com extremidade redutora (apena 6% em relação à massa total), porém os teores de sulfato e de proteínas foram semelhantes aos encontrados para as outras frações. Em coerência com a ordem de eluição observada na filtração molecular adotada para fracionamento, a última fração eluída, ou seja B1P 22-37, foi a de menor massa molecular com aproximadamente 50 KDa e baixa absorvância após reação com fenol-ácido sulfúrico.

Pode-se sugerir que os fracionamentos de B1P resultaram na separação de dois polissacarídeos distintos pela caracterização realizada. Assim, as frações B1P 1-19, B1P 20-31FF e B1P 14-21 são constituídas por polissacarídeos de maior teor de açúcares totais (~ 47%) e ácido urônico (~ 7,5%) em relação ao polissacarídeo de menor massa molecular e teor de ácido urônico (~1,4) da fração B1P 22-37, cabendo ressaltar a semelhança dos teores de sulfato e proteínas.

De maneira geral, os polissacarídeos isolados da fração B1P da alga *L. calcareum* apresentaram teores elevados de sulfato, dentro da faixa de valores já relatada para polissacarídeos isolados da espécie *Corallina pilulifera* (USOV et al, 1997).

Os polissacarídeos isolados das espécies *C. officinalis*, *B. orbigniana* e *J. rubens* são menos sulfatados (~7 %) e apresentam massas moleculares bem menores (~ 10.000); porém a porcentagem de proteínas foi semelhante ao encontrado para os polissacarídeos da espécie *L. calcareum* (NAVARRO & STORTZ, 2002).

5.4.3 Fracionamento de B2P

A fração B2P foi submetida à cromatografia de filtração molecular em coluna aberta de Sephadex G-100, eluída com água destilada, resultando no cromatograma representado na Figura 34.

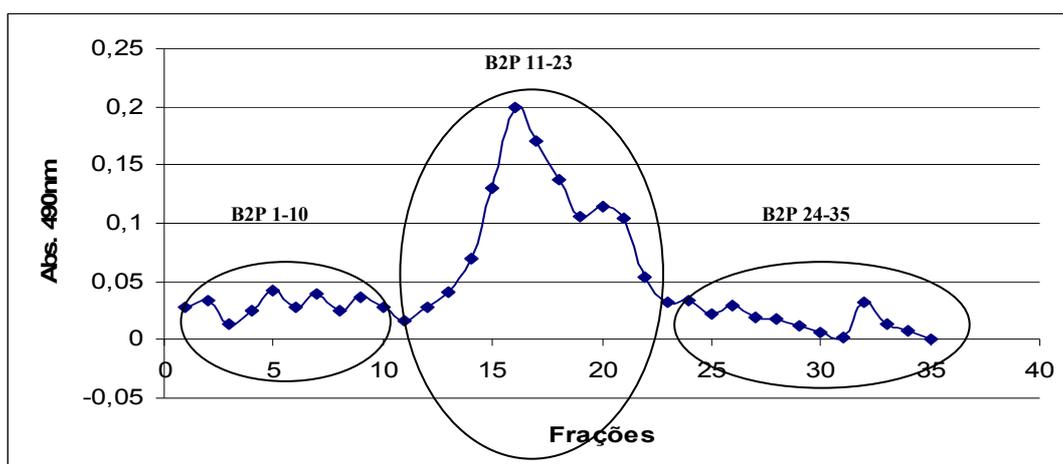


Figura 34: Fracionamento de B2P em coluna aberta de Sephadex G-100 e eluição com água destilada. Detecção no visível em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.1.9.3.

O perfil cromatográfico do fracionamento de B2P (Figura 34) foi semelhante àqueles resultantes do fracionamento de B1P (Figura 25 e Figura 27), sugerindo similaridades entre os polissacarídeos constituintes dessas frações.

As frações oriundas de B2P foram agrupadas e secas até resíduo, sob pressão reduzida, à temperatura de 50 °C. Na seqüência, foram submetidas às análises por HPSEC resultando nos cromatogramas apresentados na Figura 35.

Os cromatogramas obtidos por HPSEC indicam o isolamento de um polissacarídeo constituinte da fração B2P 1-10 com tempo de retenção de 9,7min. Já as frações B2P 11-23 e B2P 24-35 apresentaram um único pico cada, com tempo de retenção de aproximadamente 11,7 min. Apesar do tempo de retenção dos picos majoritários das frações B2P 11-23 e 24-35 serem idênticos nas análises por HPSEC, as frações não foram agrupadas. Isso é justificado pela maior absorção da fração B2P 11-23 na reação com fenol- H_2SO_4 observada no perfil de eluição (Figura 34), o que evidencia a maior porcentagem de açúcares redutores.

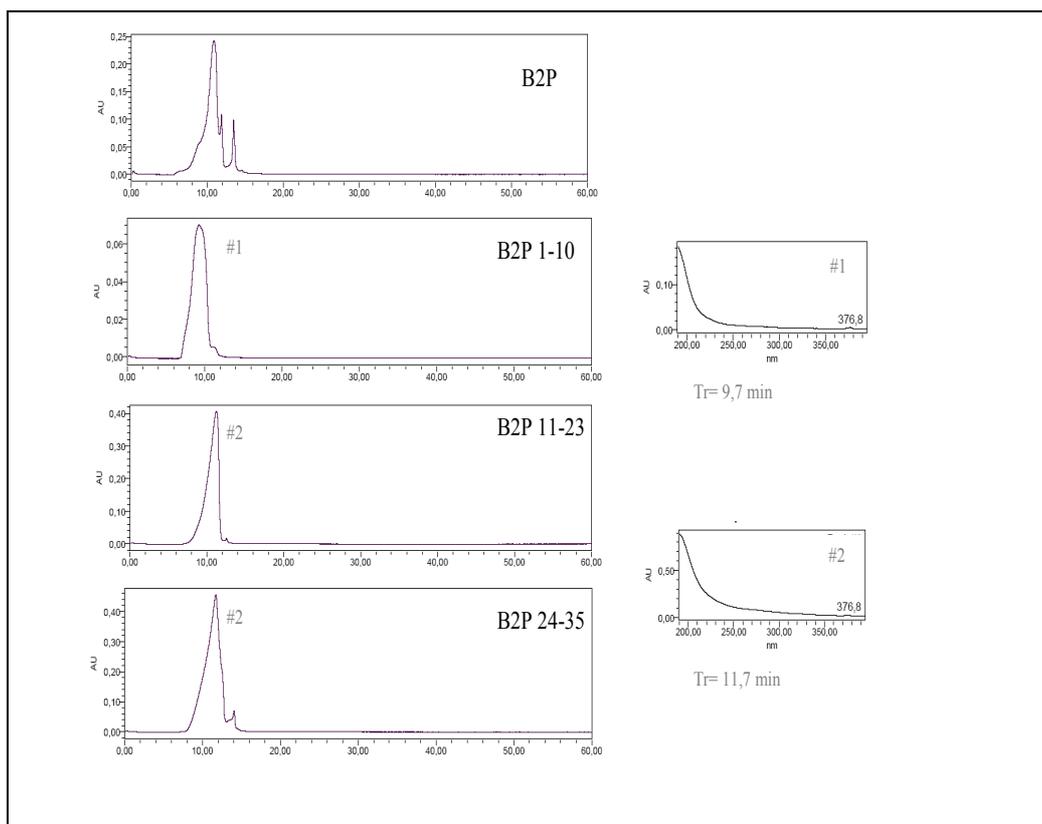


Figura 35: Cromatogramas obtidos por HPSEC-UV para B2P e frações oriundas desta (B2P 1-10, B2P 11-23, B2P 24-35).

Condições cromatográficas: coluna Ultrahydrogel Linear com eluição isocrática de água MiliQ, fluxo de 0,6mL/min, temperatura ambiente e detecção no UV_{210nm}. Apresentam-se, também, os espectros no UV registrados *on-line* para os picos destacados e seus respectivos tempos de retenção (Tr).

Foram obtidos espectros no infravermelho para as frações resultantes do fracionamento de B2P (Figura 36, 37 e 38), os quais possibilitaram identificar bandas características de polissacarídeos, conforme já discutido para as frações resultantes do fracionamento de B1P (item 5.4.2).

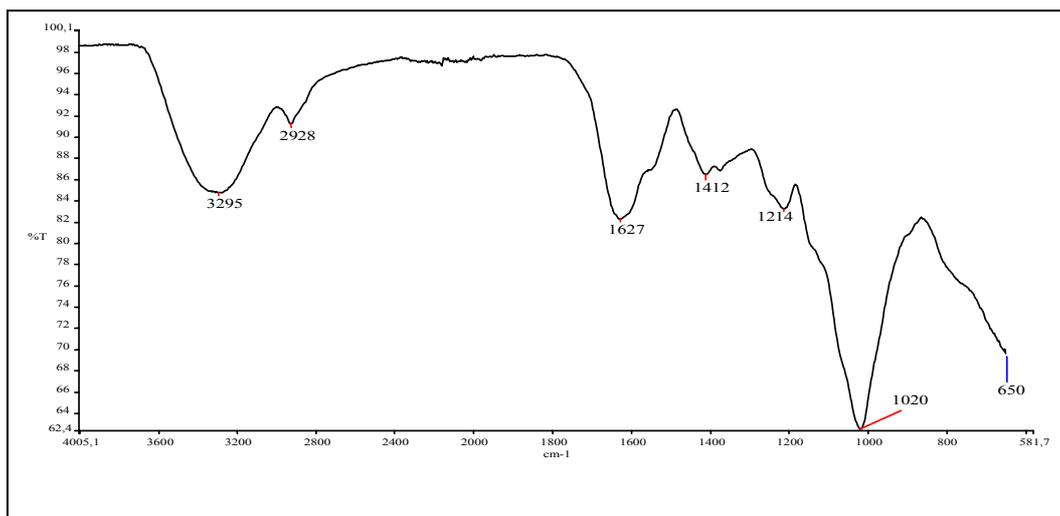


Figura 36: Espectro no infravermelho da fração B2P 1-10

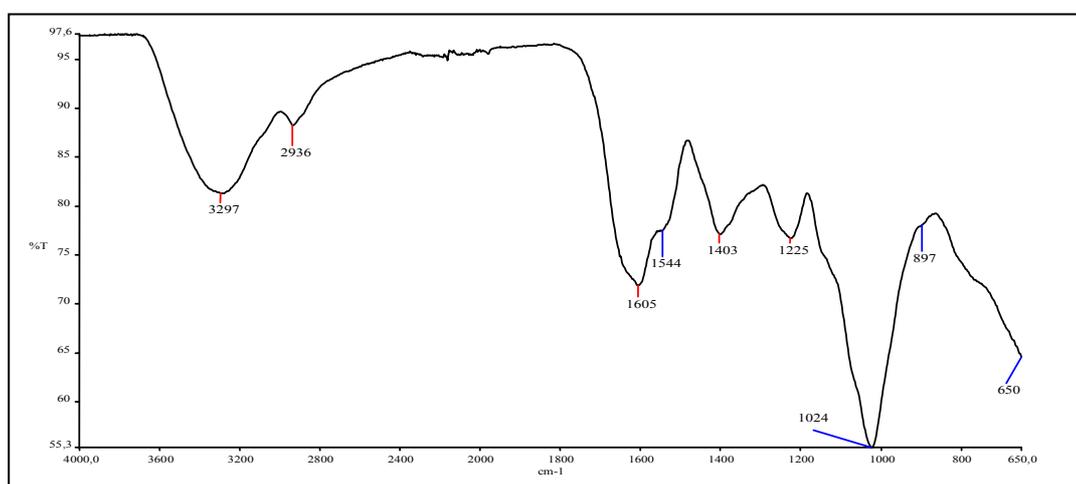


Figura 27: Espectro no infravermelho da fração B2P 11-23

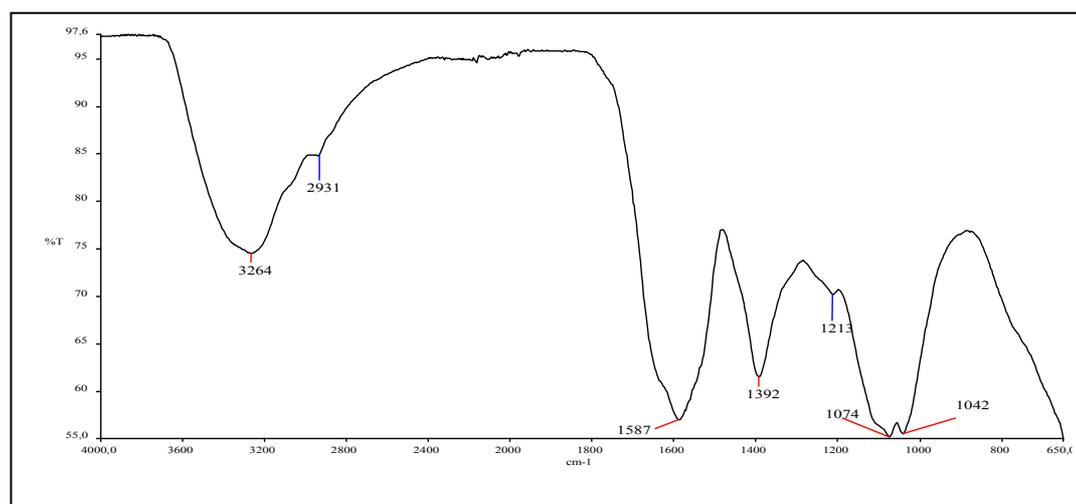


Figura 38: Espectro no infravermelho da fração B2P 24-35

Na seqüência, os polissacarídeos constituintes dessas frações foram caracterizados segundo os teores de proteína, açúcares totais, ácido urônico, sulfato e massa molecular (Tabela 13).

Tabela 13: Caracterização estrutural dos polissacarídeos oriundos do fracionamento de B2P

Fração	Caracterização química (teor % \pm d.p., $n=3$)				Massa molecular (10^4 Da)
	Proteínas	Açúcares totais	Ácido urônico	Sulfato	
B2P 1-10	32 \pm 1	34 \pm 2	9 \pm 1	9 \pm 2	27 \pm 2
B2P 11-23	14 \pm 2	51 \pm 2	6 \pm 1	18 \pm 3	18 \pm 3
B2P 24-35	3 \pm 1	10,5 \pm 0,8	1,7 \pm 0,1	3 \pm 3	7 \pm 1

As massas moleculares determinadas foram condizentes com o perfil de eluição observado na cromatografia de filtração molecular em coluna aberta de Sephadex G-100, sendo a fração inicial (B2P 1-10) correspondente ao polissacarídeo de maior massa molecular e a final (B2P 24-35) ao de menor. A fração B2P 11-23 apresenta um teor de açúcares totais consideravelmente maior que as frações B2P 24-35 e B2P 1-10, condizente com sua maior absorvância no visível em 490 nm, após reação com fenol-ácido sulfúrico (Figura 34). A fração B2P 11-23 apresentou massa molecular e teores dos constituintes quantificados na caracterização estrutural (Tabela 12) equivalentes aos polissacarídeos das frações B1P 1-19, B1P 20-31FF, B1P 1-13 e B1P 14-21 (Tabela 11), levando em conta os respectivos valores de desvio-padrão, indicando serem constituídas por polissacarídeos semelhantes ou iguais.

As caracterizações das frações resultantes dos fracionamentos originárias das extrações básicas (B1P e B2P) e da fração obtida à temperatura ambiente (FP) foram agrupadas em uma única tabela visando facilitar a comparação. O grau de sulfatação (GS) foi estimado visando facilitar comparações estruturais com outros polissacarídeos sulfatados avaliados em modelos de inibição de adesão celular (TANGELDER & ARFORS, 1991; FRITZSCHE et al, 2006), sendo calculado pela porcentagem de sulfato dividida pela porcentagem de açúcares totais. A massa molecular foi expressa em KDa também com o intuito de facilitar a comparação com os dados da literatura.

Tabela 14: Caracterização estrutural dos polissacarídeos oriundos do fracionamento de B1P, B2P e FP da alga *L. calcareum*.

Fração	Caracterização química (teor % \pm d.p., $n=3$)				GS	Massa molecular (KDa)
	Proteínas	Açúcares totais	Ácido urônico	Sulfato		
FP	3,9 \pm 0,6	48 \pm 1	1,7 \pm 0,1	37 \pm 5	0,8	38 \pm 2
*B1P 1-19	14 \pm 3	48 \pm 1	7 \pm 1	25 \pm 3	0,5	230 \pm 30
*B1P 20-31FF	10 \pm 1	45 \pm 5	7,7 \pm 0,8	20 \pm 3	0,45	160 \pm 50
B1P 1 -13	10 \pm 4	48 \pm 3	7 \pm 1	18 \pm 2	0,4	n.d.
*B1P14-21	12 \pm 4	46 \pm 5	7,4 \pm 0,3	21 \pm 1	0,46	180 \pm 50
B1P 22-37	11 \pm 3	6 \pm 1	1,4 \pm 0,1	19 \pm 3	3,2	50 \pm 10
B2P 1-10	32 \pm 1	34 \pm 2	9 \pm 1	9 \pm 2	0,6	270 \pm 20
*B2P 11-23	14 \pm 2	51 \pm 2	6 \pm 1	18 \pm 3	0,3	180 \pm 30
B2P 24-35	3 \pm 1	10,5 \pm 0,8	1,7 \pm 0,1	3 \pm 3	0,3	70 \pm 10

Nota: GS, grau de sulfatação (razão entre % de sulfato / % de açúcares totais); n.d., não determinado devido à insuficiência de massa, *,polissacarídeos com composição química semelhante (substâncias relacionadas ou idênticas).

B2P 1-10 corresponde ao polissacarídeo isolado de maior massa molecular, com aproximadamente 270 KDa. A massa molecular elevada desse constituinte pode estar relacionada à sua maior porcentagem de proteína. O polissacarídeo apresentou, também, o maior teor de ácido urônico comparável a fração B1P 20-31FF e pequena sulfatação em relação aos demais polissacarídeos isolados, com exceção do constituinte da fração B2P 24-35.

A fração B2P 24-35, em comparação com a fração B1P 22-37, apresenta teores um pouco maiores de açúcares totais e ácido urônico, além de ser menos sulfatada e possuir maior porcentagem de ligação a proteínas.

Assim é possível verificar a separação de três polissacarídeos distintos segundo a caracterização realizada, sendo o constituinte da fração B2P 11-23 similar àqueles resultantes do fracionamento de B1P (frações B1P1-19, B1P 20-31FF e B1P 14-21).

Com base nas caracterizações estruturais dos constituintes das frações oriundas de B1P e B2P pode-se concluir que as diferentes concentrações de Na₂CO₃ utilizadas na extração (1% e 2% m/v) resultam na obtenção de polissacarídeos distintos da espécie *L. calcareum*. Na extração de B2P foi isolado polissacarídeo de pequena massa molecular (70 KDa), pouco sulfatado (~3%), e com baixos teores de proteína (~3%), ácido urônico (~1,7%) e açúcares totais (~11%), constituinte da fração B2P 24-35 que não foi encontrado nas frações oriundas de B1P. Outro polissacarídeo caracterizado especificamente na fração B2P foi o constituinte da fração B2P 1-10, que apresentou massa molecular elevada (~270 KDa) em relação aos demais polissacarídeos isolados de *L. calcareum*, porém apresenta menor sulfatação (~9%) e maior teor de proteínas (~32%).

5.5 Ensaio de inibição do rolamento de leucócitos

Nos experimentos de inibição do rolamento de leucócitos em modelo de microscopia intravital *in vivo*, solução salina foi utilizada como controle negativo e fucoidina como controle positivo devido sua atividade inibitória já estabelecida (FRITZSCHE et al, 2006) e disponibilidade comercial.

Inicialmente, ensaiou-se a fração FP resultante do primeiro fracionamento de *L. calcareum* (vide caracterização no item 4.1.9.1). FP produziu aproximadamente 25% de inibição do rolamento na concentração de 10 mg/Kg (Figura 39), enquanto a fucoidina produziu 85% de inibição na mesma concentração. Quando administrada na dose de 100 mg/Kg, FP causou 53% de redução média no rolamento de leucócitos, após 10 min de ensaio.

Assim, a fração FP caracterizada como tendo baixo teor de ácido urônico ($1,7 \pm 0,1$ %) e proteínas ($3,9 \pm 0,6$ %), massa molecular aproximada de 38 KDa e GS de 0,8 apresentou significativa atividade inibitória do rolamento de leucócitos.

Nos experimentos realizados com FP não se observou hemorragia nos animais, ao contrário da administração de fucoidina. Esse fato sugere ausência de atividade anticoagulante para os polissacarídeos de *L. calcareum*, desejável no caso do uso dessas substâncias na terapia anti-inflamatória, por exemplo no tratamento de artrite. No entanto, estudos adicionais são necessários, avaliando-se outras doses, para conclusões inequívocas sobre a ausência de efeito hemorrágico.

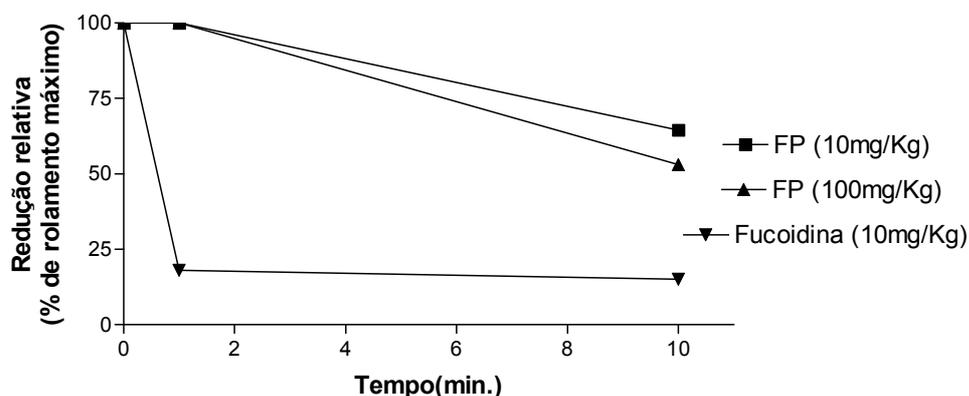


Figura 39: Redução relativa da porcentagem máxima de rolamento de leucócitos *in vivo* produzida por fucoidina (controle positivo, 10 mg/mL) e pela fração FP oriunda de *L. calcareum*. A amostra foi ensaiada na concentração de 10 e 100 mg/Kg. Os dados foram obtidos após 1 e 10 min da injeção.

As demais frações avaliadas, correspondentes aos polissacarídeos isolados, foram ensaiadas apenas na dose de 100 mg/Kg. A fração B1P 14-21 apresentou uma inibição maior após 5 min, com tendência a diminuir após 10 minutos para aproximadamente 50%. As frações B1P 22-37 e B1P 1-19 apresentaram inibições da ordem de 83% e 90%, respectivamente, após 10 minutos de administração (Figura 40). A atividade inibitória dessas frações tem magnitude semelhante ou superior àquela produzida pela fucoidina quando administrada na dose de 10 mg/Kg.

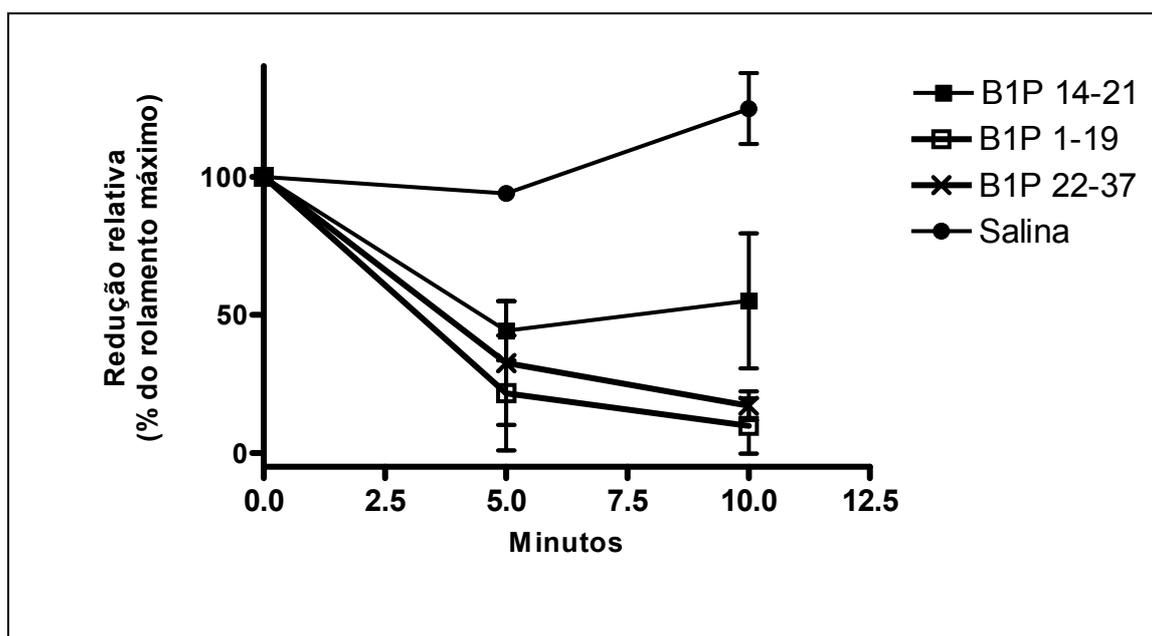


Figura 40: Redução relativa da porcentagem máxima de rolamento de leucócitos *in vivo* produzida pelas frações B1P 1-19, B1P 14-21 e B1P 22-37 oriundas de *L. calcareum*. As amostras foram ensaiadas na concentração de 100 mg/Kg. Salina foi empregada como controle negativo.

Cabe ressaltar que apesar das semelhanças na composição química dos polissacarídeos de B1P 1-19 e B1P 14-21, demonstrada pelos doseamentos dos grupos substituintes realizados para essas frações (item 4.1.9.2), elas apresentaram diferenças marcantes quanto à atividade inibitória. Possivelmente essas diferenças estão relacionadas aos arranjos tridimensionais dos grupos substituintes nessas moléculas.

De acordo com dados relatados na literatura, existe uma relação de proporcionalidade entre efeito inibitório da migração de leucócitos e grau de sulfatação (GS) do polissacarídeo, entre outros fatores (FRITZSCHE et al, 2006). Assim, a maior atividade de B1P 22-37 em comparação com as demais frações ensaiadas poderia estar relacionada ao seu elevado GS (3,0). Por sua vez, o GS observado deve-se à baixa porcentagem de açúcares totais em B1P 22-37, sendo o valor percentual absoluto de sulfato idêntico ao das frações B1P 1-19 e B1P 14-21.

Os teores de proteínas determinados para as frações B1P 1-19, B1P 14-21 e B1P 22-37, são próximos, no intervalo 11- 14 %, sugerindo que esse parâmetro não tenha influência na atividade biológica avaliada. Porém, se compararmos a fração FP com B1P 1-19 e B1P 14-21

pode-se observar uma relação entre a menor atividade inibitória de FP e sua menor porcentagem de proteínas totais (~4%), apesar de apresentar GS (0,8) superior à B1P 1-19 e B1P 14-21 (~0,5). Uma maior porcentagem de ligação a proteínas pode resultar em maior flexibilidade estrutural com o aumento da massa molecular, conferindo aos grupos de interação (supostamente sulfato) com os receptores (selectinas) maiores possibilidades de posicionamento favorável às interações. O requisito de uma massa molecular mínima para atividade foi sugerida por Fritzsche e colaboradores (2006), a partir da constatação de ausência de atividade inibitória de adesão para heparina de baixa massa molecular (3,8 KDa). A hipótese dos autores baseia-se, também, no incremento da atividade inibitória proporcionalmente à elevação da massa molecular de heparinas com mesmo grau de sulfatação (GS = 1,20).

Por outro lado, cabe ressaltar que a estrutura mínima de interação e bloqueio da adesão das três selectinas é atualmente um tetrassacarídeo (sLe^x), ou seja, uma molécula com massa molecular bastante inferior à heparina de baixa MM (3,8 KDa). A diferença de afinidade pelo receptor pode ser um diferencial nesse caso, já que a baixa afinidade de sLe^x está amplamente relatada na literatura (OHMORI et al, 2002), sendo necessária a comparação das atividades de inibição de adesão no mesmo modelo para que novas considerações possam ser formuladas.

A massa molecular aparenta ser um parâmetro relevante para a atividade inibitória, evidenciado pela menor atividade de FP e pela significativa atividade de B1P 1-19. Segundo Fritzsche e colaboradores (2006), um baixo grau de sulfatação pode ser compensado por uma maior massa molecular, suposição essa formulada a partir da observação de que a curdlana de maior massa hidrodinâmica necessitava de menor GS para produzir efeito biológico comparável às ficaranas e pululanas de menor massa. Uma análise semelhante pode ser feita no presente trabalho para explicar a semelhança na atividade biológica de B1P 1-19 e B1P 22-37. Apesar de B1P 1-19 apresentar GS (0,5) consideravelmente inferior ao de B1P 22-37 (GS = 3,2), a massa molecular mais elevada do primeiro poderia explicar sua elevada atividade biológica.

A densidade aniônica induzida pelo ácido urônico nos polissacarídeos não aparenta ser um parâmetro relevante para a atividade biológica observada. B1P 22-37, com teor de ácido urônico (AU) de aproximadamente 1,4%, foi consideravelmente mais ativo que B1P 14-21, cujo teor de AU atinge 7,4%, e também mais ativo que FP, fração que exibiu a menor atividade, com baixo teor de AU (1,7%). Ou seja, os dados obtidos não possibilitaram estabelecer nenhuma relação entre os teores desse grupo substituinte e a atividade biológica.

Evidentemente não se pode descartar que a influência desse grupo aniônico na atividade inibitória da adesão esteja relacionada à sua localização no esqueleto do polissacarídeo.

6 CONCLUSÃO

A extração da alga *Lithothamnion calcareum* em meio alcalino (Na_2CO_3 a 2 % m/v) a quente (60 °C) resultou em maior rendimento de polissacarídeos.

Polissacarídeos sulfatados são os principais constituintes da espécie, sendo isoladas quatro substâncias dessa classe a partir de cromatografia por exclusão de tamanho e troca iônica. A caracterização química (teores de açúcares totais, ácido urônico, proteínas e sulfato) dessas moléculas e a determinação de suas massas moleculares atestaram as diferenças entre elas.

Os polissacarídeos sulfatados de *L. calcareum* apresentam potencial atividade antiinflamatória, demonstrada em modelo de inibição de rolamento de leucócitos. Grau elevado de sulfatação dos polissacarídeos e/ou massa molecular elevada parecem contribuir para maior efeito inibitório de rolamento de leucócitos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWAD, N.E. Bioactive brominated diterpenes from the marine red alga *Jania Rubens* (L.) Lamx. *Phytotherapy Research*, v.18, p.275-9, 2004.

BARROS, M.P.; PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T.C.S.; CARDOZO K.H.M.; COLEPICOLO, P. Rhythmicity and oxidative/nitrosative stress in algae. *Biological Rhythm Research*, v.36, p.67-82, 2005.

BERTEAU, O & MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, v. 13, p. 29-40, 2003.

BERLINCK, R.G.S; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H.; HERNÁNDEZ, I.L.; SELEGHIM, M.H.; GRANATO, A.C.; ALMEIDA, E.V.; NUÑEZ, C.V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.G.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.O.; SILVA, C.L.; MINARINI, P.R., Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil, *Journal Natural Products*, v. 67, p.510-522, 2004.

BILAN, M.I. & USOV, A.I. Polysaccharides of Calcareous Algae and their Effect on the Calcification Process, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v.27, p. 2-16, 2001.

BLUMENKRANTZ, N. & ASBOE-HANSEN, G. New method of Quantitative Determination of Uronic Acid. *Analytical Biochemistry*, v.54, p. 484-489, 1973.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R., Marine Natural Products. *Natural Products reports*, v.23, p.26-78, 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v.72, p.248-54, 1976.

CARA, D.C. & KUBES, P. Intravital microscopy as a tool for studying recruitment and chemotaxis. *Methods in Molecular Biology*, v.239, p.123-32, 2004.

CUMASHI, A.; USHAKOVA, N.A.; PREOBRAZHENSKAYA, M.E.; D'INCECCO, A.; PICCOLI, A.; TOTANI, L.; TINARI, N.; MOROZEVICH, G.E.; BERMAN, A.E.; BILAN, M.I.; USOV, A. I.; USTYUZHANINA, N.E.; GRACHEV, A.A.; SANDERSON, C.J.; KELLY, M.; RABINOVICH, G.A.; IACOBELLI, S.; NIFANTIEVA, N.E.; A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, v. 17, p. 541–552, 2007.

DIAS, C.T.M. Granulados Bioclásticos - Algas Calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics*, v.8, p.307-318, 2000.

DÍAZ-GONZÁLEZ, F.; GONZÁLEZ-ALVARO, I.; CAMPANERO, M.R.; MOLLINEDO, F.; DEL POZO, M.; AMUÑOZ, C.; PIVEL, J.P.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; Prevention of In Vitro Neutrophil-Endothelial Attachment through Shedding of L-Selectin by Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Journal of Clinical Investigation*, v. 95, p.1756–1765, 1996.

DÍAZ-GONZÁLEZ, F. & SÁNCHEZ-MADRID, F. Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. *Immunology Today*, v. 19, p.169-72,1998.

DODGSON, K.S. & PRICE, R.G. A Note on the Determination of the Ester Sulphate Content of Sulphated Polysaccharides. *Biochemistry Journal*, v. 84, p. 106, 1962.

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

FEI, R.; FEI, Y.; ZHENG, S.; GAO, Y.; SUN, H.; ZENG, X.; Purified polysaccharide from Ginkgo biloba leaves inhibits P-selectin-mediated leucocyte adhesion and inflammation. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 29, p.499-506, 2008.

FERRIER, R.J. & COLLINS, P.M. Monosaccharides Chemistry, *Penguin Books*, 1972.

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

FRITZSCHE, J.; ALBAN, S.; LUDWIG, R. J.; RUBANT, S.; BOEHNCKE, W.; SCHUMACHER, G.; BENDAS, G.; The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, p. 474 – 485, 2006.

GALAMBOS, J.T. The reaction of carbazole with carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, vol. 19, p.119-132, 1967.

GUERRIERO, A.; D'AMBROSIO, M.; PIETRA, F. Novel Hydroxyicosatetraenoic and Hydroxyicosapentaenoic Acids and a 13-Oxo Analog. Isolation from a Mixture of the Calcareous Red Algae Lithothamnion corallioides and Lithothamnion calcareum of Brittany Waters. *Helvetica Chimica Acta*, v. 73, p.2183-2189, 2004.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; <acesso em 20 /01/08>, 2009.

HLA, T. E & NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, p.7384-7388, 1992.

HO, Y.W.; YEUNG, J.S.; CHIU, P.K.; TANG, W.M.; LIN, Z.B.; MAN, R.Y.; LAU, C.S.; Ganoderma lucidum polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.30, p.173-179, 2007.

KANSAS, G.S.; SAUNDERS, K.B.; LEY, K.; ZAKRZEWICZ, A.; GIBSON, R.M.; FURIE, B.C.; FURIE, B.; TEDDER, T.F.; A Role For the Epidermal Growth Factor-like Domain of P-Selectin in Ligand Recognition and Cell Adhesion, *The Journal of Cell Biology*, v. 124, p.609-618, 1994.

KELLY, H.; WANG, J.M.; KUBES, P.; Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v.120, p.3-10, 2007.

KNUTSON, C. A & JEANES, A. Determination of the Composition of Uronic Acid Mixtures. *Analytical Biochemistry*, v.24, p. 482-490, 1968.

KOENIG, A.; JAIN, R.; VIG, R.; NORGDARD-SUMNICHT, K.E.; MATTA, K.L.; VARKI, A.; Selectin inhibition: synthesis and evaluation of novel sialylated, sulfated and fucosylated oligosaccharides, including the major capping group of GlyCAM-1 *Glycobiology*, v. 7, p. 79-93, 1997.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *Journal of Applied Phycology*, v. 13, p.173–184, 2001.

LIN, L.Z & CAO, L.B Regulation on maturation and function of dendritic cells by Ganoderma lucidum polysaccharides. *Immunology Letters*, v. 83, p.163-169, 2002.

MAYER, A.M.S. & HAMANN, M.T.; Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous system and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*, v. 6, p.37-52, 2004.

MAYER, A.M.S. & LEHMANN, V.K.B.; Marine pharmacology in 1999: antitumor and cytotoxic compounds. *Anticancer Research*.v. 21, p.2489-2500, 2001.

MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S.; LEE, Y.C.; Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, v. 339, p. 69–72, 2005.

MCEVER. R.P.; Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconjugate Journal*, v.14, p. 585 – 591, 1997.

MELO, M. R. S; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P.; DE PAULA, R.C.M.; Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p. 491-498, 2002.

MOHAMMED, K.A.; HOSSAIN, C.F.; ZHANG, L.; BRUICK, R.K.; ZHOU, Y.D.; NAGLE, D.G.; Laurenditerpenol, a new diterpene from the tropical marine alga *Laurenciaintricata* that potently inhibits HIF-1 mediated hypoxic signaling in breast tumor cells. *Journal of Natural Products*, v. 67, p.2002-7, 2004.

MULLER, W.A.; Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory Investigation.*, v. 82, p. 521-532, 2002.

NAVARRO, D. A. & STORTZ C. A.; Isolation of xylogalactans from the Corallinales: influence of the extraction method on yields and compositions. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p.57-62, 2002.

NAVARRO, A.D., FLORES, L.M., STORTZ, C.A.; Microwave-assisted desulfation of sulfated polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 69, p. 742–747, 2007.

NEWMAN, D.J & CRAGG, G.M.; Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *Journal of Natural Products*, v. 67, p.1216-1238, 2004.

NORMAN, K.E.; ANDERSON, G.R.; KOLB, H.C.; LEY, K.; ERNST, B.; Sialyl Lewisx (sLex) and an sLex Mimetic, CGP69669A, Disrupt E-Selectin–Dependent Leukocyte Rolling In Vivo. *Blood*, v. 91, p. 475-483, 1998.

OHMORI, K.; KANDA, K.; MITSUOKA, C.; KANAMORI, A.; KURATA-MIURA, K.; SASAKI, K.; NISHI, T.; TAMATANI, T.; KANNAGI, R.; P- and E-Selectins Recognize Sialyl 6-Sulfo Lewis X, the Recently Identified L-Selectin Ligand. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 278, p.90-96, 2002.

OSTERGAARD, C.; YIENG-KOW, R.V.; BENFIELD, T.; FRIMODT-MOLLER, N.; ESPERSEN, F.; LUNDGREN, J.D.; Inhibition of leukocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infection and Immunity*, v.68, p.21770, p. 2000.

PEREIRA, R.C & GOMES, A.S. (organizadores). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro. Editora Interciencia, cap.11, p. 229-248, 2002.

POSER, G.L. Polissacarídeos. In: SIMÕES, C.M.O et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 6 ed.-Porto Alegre:Editora da UFRGS; Florianopolis:Editora da UFSC, cap. 19, p. 498-517, 2007.

QI, H.; ZHAO, T.; ZHANG, Q.; LI, Z.; ZHAO, Z.; XING, R.; Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from Ulva pertusa Kjellm (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, v.17, p.527-34, 2005.

SHI, Y., SHENG, J.; YANG, F.; HU, Q.; Purification and identification of polysaccharide derived from Chlorella pyrenoidosa. *Food Chemistry*, v. 103, p. 101-105, 2007.

SMIT, A.J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *Journal of Applied Phycology*, v.16, p.245–262, 2004.

SUN, C.; WANG, J.; FANG, L.; GAO, X.; TAN, R.; Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus Keissleriella sp. YS4108. *Life Science*, v.75, p.1063-73, 2004.

TAK, P.P.; TAYLOR, P.C.; BREEDVELD, F.C.; SMEETS, T.J.; DAHA, M.R.; KLUIN, P.M.; MEINDERS, A.E.; MAINI, R.N.; Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheumatology*, v. 39, p. 1077–1081, 1996.

TANGELDER, G.J. & ARFORS, K.E.; Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood*, v. 77, p. 1565-71, 1991.

TARRANT, T.K & PATEL, D.D.; Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*, v. 13, p. 1–14, 2006.

TU, L.; CHEN, A.; DELAHUNTY, M.D.; MOORE, K.L.; WATSON, S.R.; MCEVER, R.P.; TEDDER, T.F.; L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the

selectins determine ligand binding specificity *The Journal of Immunology*, v. 157, p.3995-4004, 1996.

USOV, I. A.; BILAN, I. M.; SHASHKOV, S. A.; Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga Corallina pilulifera P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae. *Carbohydrate Research*, v. 303, p. 93-102, 1997.

YAMANE, H.; YAMAMOTO, S.; YAMAMOTO, T.; MATSUI, K.; MIURA, Y.; TAJI, M.; SCULPTOREANU, A.; DE GROAT, W. C.; Prostaglandin E2 receptors, EP2 and EP4, differentially modulate TNF-a and IL-6 production induced by lipopolysaccharide in mouse peritoneal neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 278, p.224-228, 2000.

ZHANG, Q.; YU, P.; LI, Z.; ZHANG, H.; XU, Z.; LI, P.; Antioxidant activities of sulfated polysaccharides fractions from Porphyra haitanesis. *Journal of Applied Phycology*, v.17, p.305-310, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)