

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRUNA GOMES MALAGOLI

**POLISSACARÍDEOS DA ALGA MARINHA *Lithothamnion muelleri*: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIARTRÍTICA**

Belo Horizonte - MG

2012

BRUNA GOMES MALAGOLI

**POLISSACARÍDEOS DA ALGA MARINHA *Lithothamnion muelleri*: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIARTRÍTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga – UFMG.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rachel de Oliveira Castilho – UFMG.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNA GOMES MALAGOLI

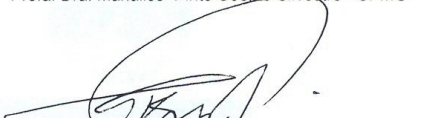
"Polissacarídeos da alga marinha *Lithothamnion muelleri*: obtenção, caracterização química e atividade antiartrítica"

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em dez de fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA



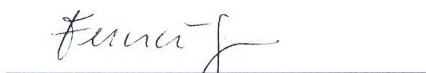
Prof. Dra. Marialice Pinto Coelho Silvestre - UFMG



Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes - UFMG



Prof. Dra. Rachel de Oliveira Castilho - UFMG



Prof. Dr. Fernão Castro Braga - UFMG

*Ao meu marido, amigo, companheiro e grande
incentivador Miguel, por me ajudar a seguir em frente nos
momentos de medo e pelo amor incondicional, sempre!*

AGRADECIMENTOS

Considerando o período de dois anos de muito trabalho e muita pesquisa, não são poucos os agradecimentos que tenho a fazer. Vários colaboraram, direta ou indiretamente, para a conclusão dessa dissertação e a todos sou grata.

Inicialmente, agradeço ao professor Fernão, por abrir-me as portas do mundo acadêmico, pela confiança em meu trabalho e pelos ensinamentos mil. Aos amigos da fitoquímica, cada um a seu modo sempre me ajudando e formando uma segunda família para mim. À professora Rachel, por todas as dicas valiosas. À Ana Bárbara, minha grande amiga, pelos sorrisos e pelas lágrimas compartilhadas desde a graduação! À Eliana, pelo exemplo de profissional e ser humano maravilhoso. À Mariana, pela amizade e por ouvir meus desabaços. Ao Tálisson, pelas ajudas incontáveis. À Raquel, mais do que técnica, amiga e ajudante! À Priscilla, companheira de bancada, pelo carinho e alegria! À Cristiane que, mesmo estando distante, sempre me ajudou com as dúvidas. À Ydia e à Jussara, por me ajudarem a dar o pontapé inicial no mundo da pesquisa. Ao José Hugo, braço direito e esquerdo, pela participação fundamental nessa jornada. Ao Rodrigo, pelas sugestões fantásticas e por me fazer crer em minha capacidade. À Karlinha, pelas palavras de sabedoria e alento. À Juliana, companheira de medos e desafios e uma grande amiga conquistada em pouco tempo! À Renata, pelo socorro com as referências bibliográficas! Aos amigos Patrícia, Celinho, Bruna Maximino, Taís, Ana Carolina, Maria Fernanda, Suzan, Fabíola, Grasielle e Graça pelo companheirismo. A todos aqueles que estiveram na fitoquímica ao meu lado, contribuindo cada um à sua maneira.

Ao professor Mauro Martins Teixeira (Departamento de Bioquímica, ICB, UFMG), às professoras Danielle da Glória de Souza (Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG) e Vanessa Pinho da Silva (Departamento de Morfologia, ICB, UFMG), ao Dr. Flávio Almeida Amaral e a toda a equipe do ICB pela colaboração nos ensaios biológicos. Em especial, agradeço à Vivian Vasconcelos Costa, que além de ser uma excelente profissional sempre esteve disposta a me auxiliar com um milhão de dúvidas!

À Vany Perpetua Ferraz (Departamento de Química, ICEX, UFMG), pelas análises de cromatografia gasosa e pela receptividade com a qual me recebeu!

À professora Mônica, pelas sugestões valiosas e pronta disponibilidade.

Aos amigos da QF, em especial Marcela, Saulo, Saulo Braga, pelos ótimos momentos estudando juntos e ao professor Ricardo, por todos os ensinamentos.

À Francielle, por ser uma pessoa querida que conheci nessa jornada e que me auxiliou em muitas etapas!

Aos meus pais, por sempre me incentivarem da sua maneira torta e por permitirem que tudo isso fosse possível. Obrigada pela vida!

Aos meus dois irmãos queridos, companheiros de brigas e alegrias, enchendo a minha vida de felicidade por não ser filha única!

Aos meus avós, verdadeiros pais, sempre presentes compartilhando todos os momentos de minha vida.

Ao meu grande amor, Miguel, por compartilhar comigo todos os momentos e todos os detalhes, pelos incentivos, críticas, sugestões, paciência, carinho, compreensão e, principalmente, por me fazer ser quem sou!

RESUMO

Organismos marinhos constituem uma fonte promissora de substâncias bioativas, incluindo as algas vermelhas, que produzem polissacarídeos sulfatados com diferentes propriedades biológicas. O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar polissacarídeos da alga marinha *Lithothamnion muelleri* Lenormand ex Rosanoff (Hapalidiaceae), bem como avaliar a atividade antiartrítica desses compostos. A espécie é comercializada como suplemento alimentar no Brasil devido ao elevado teor de minerais. O material ficológico em estudo foi fornecido pela empresa produtora do suplemento, na forma de um pó granulado. A quantificação de elementos minerais no granulado, realizada por ICP-AES, indicou cálcio ($34,76 \pm 0,42\%$) e magnésio ($2,71 \pm 0,07\%$) como constituintes principais. Frações enriquecidas em polissacarídeos foram obtidas pela extração sequencial do granulado com soluções aquosas de Na_2CO_3 a 1% e 2%, a 60 °C, por duas horas, originando as frações B1 e B2, respectivamente, seguindo-se precipitação com etanol (4:1 v/v) e diálise do precipitado em membrana de celulose. Os rendimentos extrativos variaram de $0,1034 \pm 0,0038\%$ a $0,1296 \pm 0,0070\%$ m/m. As frações enriquecidas foram submetidas à cromatografia de exclusão por tamanho (Sephadex G-100), originando as sub-frações Fra B1 e Fra B2. A natureza polissacarídica de B1, B2, Fra B1 e Fra B2 foi caracterizada por métodos químicos, cromatográficos e espectroscópicos, bem como a presença de ácidos urônicos e sulfato. Os polissacarídeos de B1 e B2 apresentaram massas moleculares entre $43,01 \pm 4,26$ e $60,70 \pm 4,90$ kDa e teor de ácidos urônicos de $4,17 \pm 0,08$ a $5,07 \pm 0,10\%$. A composição dos polissacarídeos também foi determinada em relação aos teores de proteínas ($2,49 \pm 0,04$ a $3,78 \pm 0,02\%$), açúcares totais ($26,87 \pm 0,82$ a $34,69 \pm 0,81\%$) e grupos sulfato ($8,94 \pm 0,25$ a $11,70 \pm 0,21\%$). A composição monossacarídica foi investigada em hidrolisados de B1 e B2, utilizando CCD de celulose e GC-FID, que indicaram uma xilogalactana sulfatada como polissacarídeo majoritário de *L. muelleri*, com teores elevados também de glicose, manose e ácido glicurônico. A atividade biológica do granulado de *L. muelleri* e das frações B1 e B2 foi avaliada em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos C57BL/6. A administração *per os* de *L. muelleri* (100 mg/kg), B1 (1 mg/kg) e B2 (1 mg/kg), por 10 dias, induziu significativo efeito antiinflamatório e anti-hipernociceptivo. Todos os tratamentos

reduziram o infiltrado celular na cavidade articular e no tecido periarticular. Experimentos com microscopia intravital indicaram redução da adesão celular no endotélio vascular para todos os tratamentos. O carbonato de cálcio, principal constituinte mineral de *L. muelleri*, não ocasionou efeito antiinflamatório em nenhum dos parâmetros avaliados, indicando que polissacarídeos sulfatados são os responsáveis pela atividade antiartrítica da espécie. Em suma, um polissacarídeo majoritário de *L. muelleri* foi isolado e caracterizado quimicamente, tendo-se demonstrado seu envolvimento direto na atividade antiartrítica da espécie em modelo *in vivo*.

Palavras-chave: *Lithothamnion muelleri*; alga marinha; polissacarídeos sulfatados; xilogalactana; atividade antiartrítica.

ABSTRACT

Marine organisms are a promising source of bioactive compounds, including red seaweeds, which are known to produce sulfated polysaccharides with different biological properties. The aim of this study was to obtain and characterize polysaccharide-rich fractions of the marine red alga *Lithothamnion muelleri* Lenormand ex Rosanoff (Hapalidiaceae), as well as to evaluate their anti-arthritis activity. The alga is commercialized as food supplement in Brazil in view of its mineral content. The algal material employed in the study was furnished by a Brazilian company as a granulated powder. The mineral composition of the algal material was determined by ICP-AES and pointed out calcium ($34.76 \pm 0.42\%$) and magnesium ($2.71 \pm 0.07\%$) as major constituents. Polysaccharide-rich fractions were obtained by extraction of the algal material at 60°C , for 2 hours, sequentially with 1% and 2% w/v Na_2CO_3 aqueous solution, affording fractions B1 and B2, respectively, followed by precipitation with ethanol (4:1 v/v) and dialysis of the precipitate against water in a cellulose membrane. Extraction yields ranged from 0.1034 ± 0.0038 to $0.1296 \pm 0.0070\%$ w/w. The fractions were submitted to size exclusion chromatography (Sephadex G-100), giving sub-fractions Fra B1 and Fra B2. The polysaccharide nature of B1, B2, Fra B1 and Fra B2 was characterized by chemical, chromatographic and spectroscopic methods, along with the presence of uronic acids and sulfate groups. The polysaccharides presented molecular weight in the range 43.01 ± 4.26 to 60.70 ± 4.90 kDa and uronic acid contents from 4.17 ± 0.08 to $5.07 \pm 0.10\%$. Their composition was also characterized in terms of proteins (2.49 ± 0.04 to $3.78 \pm 0.02\%$), total sugars (26.87 ± 0.82 and $34.69 \pm 0.81\%$) and sulfate (8.94 ± 0.25 to $11.70 \pm 0.21\%$) contents. The monosaccharide constituents were investigated in hydrolyzed samples of B1 and B2 by TLC on cellulose and GC-FID analyses, which disclosed a sulfated xylogalactan as the main polysaccharide of *L. muelleri*, with high contents also of glucose, mannose and glucuronic acid. The biological activity of *L. muelleri*, B1 and B2 was tested using a model of antigen-induced arthritis in C57BL/6 mice. The administration of *L. muelleri* (100 mg/kg), B1 (1 mg/kg) and B2 (1 mg/kg) *per os*, for 10 days, induced significant anti-inflammatory and anti-hypernociceptive response in the animals. All treatments reduced cell infiltration in the knee cavity and periarticular tissue. Besides, all treatments lowered

cell adhesion in the vascular endothelium, as shown by intravital microscopy experiments. Histological analyses revealed smaller damages in the knee after treatment with the alga, B1 and B2. Calcium carbonate, the major mineral found in *L. muelleri*, did not induced anti-inflammatory activity, thus indicating that sulfated polysaccharides are responsible for the anti-arthritis effect of the species. In conclusion, the major polysaccharide of *L. muelleri* was isolated and chemically characterized, and its participation on the anti-arthritis activity of the alga has been demonstrated *in vivo*.

Keywords: *Lithothamnion muelleri*; marine alga; sulfated polysaccharides; xylogalactan; anti-arthritis activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Fragmentos calcários da espécie <i>Lithothamnion muelleri</i>	27
Figura 2.2 Eicosanóides isolados de mistura de <i>L. calcareum</i> e <i>L. corallioides</i>	29
Figura 2.3 Estruturas básicas dos dissacarídeos característicos dos quatro grupos principais de galactanas encontradas em algas vermelhas. Fonte: BILAN & USOV, 2001 (adaptado).....	30
Figura 2.4 Representação esquemática do processo de migração celular. Fonte: PHILLIPSON & KUBES, 2011 (adaptado).....	36
Figura 3.1 Representação esquemática do processo de extração aquosa seguida de extrações alcalinas de <i>L. muelleri</i>	45
Figura 3.2 Representação esquemática do processo de extrações alcalinas sequenciais de <i>L. muelleri</i>	46
Figura 3.3 Representação esquemática dos procedimentos utilizados para a obtenção das frações enriquecidas em polissacarídeos.....	47
Figura 4.1 Perfil cromatográfico do hidrolisado das frações B1 e B2, obtido por CCD de celulose. Eluente: <i>n</i> -BuOH:EtOAc:Py:H ₂ O (6:1:5:4). Revelador: anilina:ácido ftálico..	74
Figura 4.2 Perfil cromatográfico de mistura de hidrolisados das frações B1 e B2, obtida por CCD de celulose. Eluente: <i>n</i> -BuOH:EtOAc:Py:H ₂ O (6:1:5:4). Revelador: anilina:ácido ftálico.....	75
Figura 4.3 Perfil cromatográfico do fracionamento 1 de B1 em coluna aberta de Sephadex G-100 (45 × 3 cm d.i.) e eluição com água destilada. Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.....	76
Figura 4.4 Perfil cromatográfico do fracionamento 2 de B1 em coluna de Sephadex G-100 (30 × 2,5 cm d.i.) e eluição com água destilada sob fluxo controlado (0,5 mL/min). Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.....	77
Figura 4.5 Perfil cromatográfico do fracionamento 3 de B1 em coluna de Sephadex G-100 (70 × 2,5 cm d.i.) e eluição com água destilada sob fluxo controlado (0,8 mL/min). Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.....	78
Figura 4.6 Perfil cromatográfico do fracionamento 4 de B1 em coluna de Sephadex G-100 (70 × 2,5 cm d.i.) e eluição com água destilada sob fluxo controlado (0,8 mL/min). Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.....	79
Figura 4.7 Perfil cromatográfico do fracionamento de B2 em coluna de Sephadex G-100 (70 × 2,5 cm d.i.) e eluição com água destilada sob fluxo controlado (0,8 mL/min). Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.....	80
Figura 4.8 Cromatogramas obtidos por HPSEC para as frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 3.9.....	81
Figura 4.9 Espectros no infravermelho obtidos para as frações enriquecidas em polissacarídeos B1 (A) e B2 (B).....	83
Figura 4.10 Sobreposição dos espectros no infravermelho obtidos para as frações B1 (rosa) e B2 (azul).....	84

Figura 4.11 Fundamento químico da reação colorimétrica com fenol-H ₂ SO ₄ para quantificação de açúcares totais em polissacarídeos.....	85
Figura 4.12 Espectros de varredura no UV/VIS para as frações B1 (A), B2 (B), Fra B1 (C) e Fra B2 (D) após reação colorimétrica com fenol-H ₂ SO ₄ para quantificação de açúcares totais.....	86
Figura 4.13 Espectros de varredura no UV/VIS para a solução de leitura de B1 com (A) e sem (B) a adição dos reagentes colorimétricos para quantificação de açúcares totais.....	87
Figura 4.14 Curva analítica para quantificação espectrofotométrica de açúcares totais empregando galactose como substância de referência e detecção em $\lambda=490$ nm.....	88
Figura 4.15 Espectros de varredura no UV/VIS para a solução de leitura de B1 com (A) e sem (B) a adição dos reagentes para quantificação de sulfato.....	89
Figura 4.16 Curva analítica para quantificação espectrofotométrica de sulfato empregando sulfato de potássio como substância de referência e detecção em $\lambda=500$ nm.....	90
Figura 4.17 Formas do corante Coomassie Brilliant Blue G-250. Forma vermelha (A), $\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm; forma verde (B), $\lambda_{\text{máx}}$ 650 nm; forma azul (C), $\lambda_{\text{máx}}$ 595 nm.....	92
Figura 4.18 Espectros de varredura no UV/VIS para a solução de leitura de B1 com (A) e sem (B) a adição do reagente de cor para a quantificação de proteínas totais.....	93
Figura 4.19 Curva analítica para quantificação espectrofotométrica de proteínas totais empregando albumina de soro bovino como substância de referência e detecção em $\lambda=595$ nm.....	94
Figura 4.20 Espectros de varredura no UV/VIS para a solução de leitura de B1 com (A) e sem (B) a adição do reagente de cor para a quantificação de ácidos urônicos.....	95
Figura 4.21 Curva analítica para quantificação espectrofotométrica de ácidos urônicos empregando ácido glicurônico como substância de referência e detecção em $\lambda=525$ nm.....	96
Figura 4.22 Subunidade de maltotriose constituinte das pululanas.....	98
Figura 4.23 Curva de calibração obtida com padrões de pululanas para a determinação das massas moleculares aparentes dos polissacarídeos de <i>L. muelleri</i>	99
Figura 4.24 Representação esquemática da formação de acetatos de alditóis.....	101
Figura 4.25 Cromatogramas, obtidos por GC-FID, para os acetatos de alditóis de monossacarídeos de referência (A) e de açúcares provenientes da hidrólise ácida das frações B1 (B), B2 (C), Fra B1 (D) e Fra B2 (E). 0: CHCl ₃ (solvente); 1: ramnose; 2: arabinose; 3: xilose; 4: manose; 5: galactose; 6: glicose.....	103
Figura 4.26 Cromatogramas, obtidos por GC-FID, para os hidrolisados parciais derivatizados de B1 (A) e B2 (B). 0: CHCl ₃ (solvente).....	107
Figura 4.27 Efeito induzido pelo granulado de <i>L. muelleri</i> (100 mg/kg) sobre o número de neutrófilos na cavidade articular (A) e tecido periarticular (B), concentração de CXCL1 (C) e CXCL2 (D) e hipernocicepção mecânica (E) em modelo de AIA. Foram avaliados cinco e dez dias de tratamento. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=7$ animais por grupo). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (PBS); # $p<0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com	

pós-teste de Student-Newman-Keuls).....	110
Figura 4.28 Efeito induzido pelo granulado de <i>L. muelleri</i> (10 dias de tratamento) sobre o número de neutrófilos na cavidade articular (A) e no tecido periarticular (B), concentração de CXCL1 (C) e CXCL2 (D) e hipernocicepção mecânica (E) em modelo de AIA. Foram avaliadas as doses de 10, 30 e 100 mg/kg. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n=7 animais por grupo). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle (PBS); # p<0,05 quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).....	112
Figura 4.29 Efeito induzido pelo granulado de <i>L. muelleri</i> (100 mg/kg) e carbonato de cálcio (100 mg/kg), sobre o número de neutrófilos na cavidade articular (A) e no tecido periarticular (B), conteúdo de proteoglicanos (C) e hipernocicepção mecânica (D) em modelo de AIA. Também é apresentado o índice de artrite (E), determinado histologicamente. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n=7 animais por grupo). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle (PBS); # p<0,05 quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).....	113
Figura 4.30 Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados e desafiados com PBS (A) ou mBSA (B, C, D). As seções das articulações do joelho foram coradas com hematoxilina e eosina e evidenciam o aumento do infiltrado inflamatório no tecido periarticular dos animais artríticos (B) ou tratados com CaCO ₃ (D), em relação ao grupo controle (A) e aos animais tratados com <i>L. muelleri</i> (C). Aumento de 40x.....	114
Figura 4.31 Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados e desafiados com PBS (A) ou mBSA (B, C, D). As seções das articulações do joelho foram coradas com azul de toluidina e evidenciam a perda de proteoglicanos na cartilagem dos animais artríticos (B) ou tratados com CaCO ₃ (D), em relação ao grupo controle (A) e aos animais tratados com <i>L. muelleri</i> (C). Aumento de 40x.....	114
Figura 4.32 Efeito induzido pelo granulado de <i>L. muelleri</i> (100 mg/kg) e CaCO ₃ (100 mg/kg), no rolamento (A) e adesão (B) dos leucócitos no endotélio da microvasculatura sinovial. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n=7 animais por grupo). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle (PBS); # p<0,05 quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).....	115
Figura 4.33 Efeito induzido pelo granulado de <i>L. muelleri</i> (100 mg/kg) e as frações enriquecidas em polissacarídeos B1 (1 mg/kg) e B2 (1 mg/kg) sobre o número de neutrófilos na cavidade articular (A) e no tecido periarticular (B), conteúdo de proteoglicanos (C) e hipernocicepção mecânica (D) em modelo de AIA. Também é apresentado o índice de artrite (E), determinado histologicamente. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n=7 animais por grupo). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle (PBS); # p<0,05 quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).....	117
Figura 4.34 Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados e desafiados com PBS (A) ou mBSA (B, C, D, E). As seções das articulações do joelho foram coradas com hematoxilina e eosina, evidenciando o aumento do infiltrado inflamatório no tecido periarticular dos animais artríticos (B) em relação aos grupos tratados com <i>L. muelleri</i> (C), B1 (D) e B2 (E). Aumento de 40x.....	118
Figura 4.35 Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados e desafiados com PBS (A) ou mBSA (B, C, D, E). As seções das articulações do joelho foram coradas com azul de toluidina e evidenciam a perda de proteoglicanos na cartilagem dos animais artríticos (B) em relação aos grupos tratados com <i>L. muelleri</i> (C), B1 (D) e B2 (E). Aumento de 40x.....	118

Figura 4.36 Efeito induzido pelo granulado de *L. muelleri* (100 mg/kg) e pelas frações enriquecidas em polissacarídeos B1 (1 mg/kg) e B2 (1 mg/kg) no rolamento (A) e adesão (B) dos leucócitos no endotélio da microvasculatura sinovial. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=7$ animais por grupo). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (PBS); # $p<0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).....

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Composição mineral do granulado de <i>L. muelleri</i>	70
Tabela 4.2 Rendimentos, expressos como somatório das frações enriquecidas em polissacarídeos, nos processos extrativos avaliados.....	71
Tabela 4.3 Rendimentos, expressos como somatório das frações B1 e B2, em diferentes tempos de extração.....	72
Tabela 4.4 Rendimentos, expressos como somatório das frações B1 e B2, nos solventes empregados para a precipitação dos polissacarídeos.....	73
Tabela 4.5 Dados empregados na construção da curva analítica de galactose para o doseamento espectrofotométrico de açúcares totais.....	87
Tabela 4.6 Teores médios de açúcares totais, expressos em termos de galactose, nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2.....	88
Tabela 4.7 Dados empregados na construção da curva analítica de íons SO_4^{2-} para o doseamento turbidimétrico de sulfato.....	90
Tabela 4.8 Teores médios de grupos sulfato, expressos em termos de íons SO_4^{2-} , nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2.....	91
Tabela 4.9 Dados empregados na construção da curva analítica de albumina de soro bovino para o doseamento espectrofotométrico de proteínas totais.....	93
Tabela 4.10 Teores médios de proteínas totais, expressos em termos de albumina de soro bovino, nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2.....	94
Tabela 4.11 Dados empregados na construção da curva analítica de ácido glicurônico para o doseamento espectrofotométrico de ácidos urônicos.....	96
Tabela 4.12 Teores médios de ácidos urônicos, expressos como ácido glicurônico, nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2.....	97
Tabela 4.13 Dados empregados na construção da curva de calibração para a estimativa da massa molecular dos polissacarídeos por HPSEC, utilizando padrões de pululanas.....	98
Tabela 4.14 Massa molecular aparente dos polissacarídeos das frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 de <i>L. muelleri</i>	99
Tabela 4.15 Análise da composição química das frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 de <i>L. muelleri</i>	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Comprimento de onda
%mol	Porcentagem molar relativa
AIA	Artrite induzida por antígeno
AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
AR	Artrite reumatóide
BSA	Albumina de soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFA	Adjuvante completo de Freund
CHCl_3	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CXCL	Quimiocina CXC ligante
CXCR	Receptor de quimiocinas CXC
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de arranjo de diodos
DMCD	Drogas modificadoras do curso da doença
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EtOAc	Acetato de etila
GC	Cromatografia gasosa (<i>gas chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (<i>gas chromatography with flame ionization detection</i>)
HE	Hematoxilina e eosina
HETAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio (<i>hexa-decyltrimethylammonium bromide</i>)
HPSEC	Cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho (<i>high performance size exclusion chromatography</i>)
ICP-AES	Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (<i>inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy</i>)
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo

mBSA	Albumina de soro bovino metilada (<i>methylated bovine serum albumin</i>)
MCP	Proteína quimioatraente para monócitos (<i>monocyte chemoattractant protein</i>)
MM	Massa molecular
MPO	Mieloperoxidase
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
NF	Fator nuclear (<i>nuclear factor</i>)
P.A.	Para análise
P.S.	Para síntese
PBS	Tampão fosfato salina (<i>phosphate buffered saline</i>)
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial e plaquetária (<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
Py	Piridina
r.p.m.	Rotações por minuto
r^2	Coeficiente de determinação
Rf	Fator de retenção (<i>retention factor</i>)
RMR	Razão molar relativa
TB	Azul de toluidina (<i>toluidine blue</i>)
TCA	Ácido tricloroacético (<i>trichloroacetic acid</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TMB	Tetrametilbenzina
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Objetivos.....	23
<u>1.1.1 Objetivo geral.....</u>	23
<u>1.1.2 Objetivos específicos.....</u>	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Algas vermelhas calcárias.....	25
<u>2.1.1 O gênero <i>Lithothamnion</i> e a espécie <i>Lithothamnion muelleri</i>.....</u>	26
2.2 Polissacarídeos sulfatados de algas e atividades biológicas.....	30
2.3 Artrite reumatóide.....	33
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	39
3.1 Equipamentos.....	39
3.2 Solventes e reagentes.....	41
3.3 Materiais de consumo.....	42
3.4 Material ficológico.....	43
<u>3.4.1 Análise da composição mineral do granulado de <i>L. muelleri</i>.....</u>	43
3.5 Preparo dos extratos.....	44
<u>3.5.1 Extração aquosa seguida de extrações alcalinas.....</u>	44
<u>3.5.2 Extrações alcalinas subsequentes.....</u>	45
3.6 Obtenção das frações enriquecidas em polissacarídeos.....	47
3.7 Análise das frações enriquecidas em polissacarídeos por cromatografia em camada delgada.....	48
<u>3.7.1 Hidrólise ácida total.....</u>	48
<u>3.7.2 Cromatografia em camada delgada.....</u>	48

3.8 Fracionamentos cromatográficos.....	49
<u>3.8.1 Preparo das amostras.....</u>	49
<u>3.8.2 Monitoramento.....</u>	49
<u>3.8.3 Fracionamento de B1.....</u>	50
<u>3.8.4 Fracionamento de B2.....</u>	50
3.9 Perfis cromatográficos por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho.....	51
3.10 Caracterização estrutural dos polissacarídeos.....	51
<u>3.10.1 Espectroscopia no infravermelho.....</u>	51
<u>3.10.2 Espectroscopia no ultravioleta/visível.....</u>	51
<u>3.10.3 Quantificação de açúcares totais.....</u>	52
<u>3.10.4 Quantificação de sulfato.....</u>	53
<u>3.10.5 Quantificação de proteínas totais.....</u>	55
<u>3.10.6 Quantificação de ácidos urônicos.....</u>	57
<u>3.10.7 Determinação da massa molecular.....</u>	59
<u>3.10.8 Avaliação da composição química dos polissacarídeos por cromatografia gasosa.....</u>	60
<u>3.10.8.1 Hidrólise ácida total.....</u>	60
<u>3.10.8.2 Hidrólise ácida parcial.....</u>	60
<u>3.10.8.3 Redução e acetilação.....</u>	61
<u>3.10.8.4 Análise por cromatografia gasosa.....</u>	61
3.11 Avaliação da atividade antiartrítica.....	62
<u>3.11.1 Indução da artrite.....</u>	63
<u>3.11.2 Administração dos tratamentos.....</u>	63
<u>3.11.3 Ensaio de hipernocicepção.....</u>	64

<u>3.11.4 Migração de neutrófilos para a cavidade articular.....</u>	65
<u>3.11.4.1 Contagem total dos leucócitos.....</u>	65
<u>3.11.4.2 Contagem diferencial dos leucócitos.....</u>	65
<u>3.11.5 Análises histopatológicas.....</u>	66
<u>3.11.6 Determinação de quimiocinas no tecido periarticular.....</u>	67
<u>3.11.7 Avaliação da atividade de mieloperoxidase.....</u>	67
<u>3.11.8 Avaliação do recrutamento de leucócitos na microvasculatura do joelho.....</u>	68
<u>3.11.9 Análises estatísticas.....</u>	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1 Composição mineral do granulado de <i>L. muelleri</i>.....	70
4.2 Avaliação das condições extrativas e de obtenção das frações enriquecidas em polissacarídeos.....	71
4.3 Análise da composição química qualitativa das frações enriquecidas em polissacarídeos.....	73
4.4 Fracionamentos cromatográficos.....	75
<u>4.4.1 Fracionamento de B1.....</u>	75
<u>4.4.2 Fracionamento de B2.....</u>	79
4.5 Análises por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho.....	80
4.6 Caracterização estrutural dos polissacarídeos.....	82
<u>4.6.1 Espectroscopia no infravermelho.....</u>	82
<u>4.6.2 Espectroscopia no ultravioleta/visível.....</u>	85
<u>4.6.3 Quantificação de açúcares totais.....</u>	86
<u>4.6.4 Quantificação de grupos sulfato.....</u>	89
<u>4.6.5 Quantificação de proteínas totais.....</u>	91

<u>4.6.6 Quantificação de ácidos urônicos.....</u>	94
<u>4.6.7 Determinação da massa molecular aparente dos polissacarídeos...</u>	97
<u>4.6.8 Avaliação da composição química dos polissacarídeos por cromatografia gasosa.....</u>	99
<u>4.6.8.1 Hidrólise parcial dos polissacarídeos de <i>L. muelleri</i>.....</u>	106
4.7 Avaliação da atividade antiartrítica de <i>L. muelleri</i>.....	108
4.8 Papel dos polissacarídeos na atividade antiartrítica de <i>L. muelleri</i>.....	119
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
6 CONCLUSÕES.....	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

1 INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais contribui de forma notável para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Os produtos naturais podem constituir fármacos ou servirem de protótipos moleculares para a síntese de derivados e descoberta de novos grupos farmacofóricos. Dentre as novas entidades químicas lançadas no mercado nas duas últimas décadas, estima-se que aproximadamente 50% delas derivem direta ou indiretamente de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2007).

A maior parte dos estudos desenvolvidos nesse campo do conhecimento consiste na investigação de organismos terrestres, enquanto a fauna e flora oceânicas representam um vasto ambiente ainda pouco explorado. Porém, o interesse pelos compostos marinhos com potencial terapêutico vem crescendo significativamente nos últimos anos. Esta afirmativa é respaldada pelas várias revisões publicadas sobre o tema nos últimos dez anos e a existência de um número crescente de produtos naturais marinhos em estudos pré-clínicos e clínicos (GLASER & MAYER, 2009; MAYER *et al.*, 2010; NASTRUCCI & RUSSO, 2012). Outro ponto relevante é a criação de empresas especializadas no desenvolvimento de novos fármacos a partir de compostos marinhos, como a *PharmaMar*, fundada em 1986 na Espanha, e a *Nereus Pharmaceuticals*, estabelecida em 1998 nos Estados Unidos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Grande parte das substâncias produzidas por organismos marinhos possuem estruturas químicas diversas daquelas encontradas em produtos de origem terrestre. Esse novo universo de substâncias amplia o leque de compostos naturais com potenciais atividades biológicas. A fim de explorar o potencial dessas substâncias é necessário desenvolver e aprimorar técnicas de isolamento e purificação, bem como empreender estudos de rotas biossintéticas (PINTO *et al.*, 2002).

Dentre os organismos marinhos de interesse, as algas constituem uma fonte promissora de novas substâncias. A alta competitividade dos ambientes aquáticos leva as algas a desenvolverem estratégias de defesa, o que culmina com a

produção de vários compostos a partir de diferentes vias metabólicas (MARINHO-SORIANO *et al.*, 2011). Diversos trabalhos recentes demonstram a importância desses organismos na descoberta de compostos de diferentes classes e com diversas atividades biológicas, reforçando a importância de novas pesquisas (COSTA *et al.*, 2010; BLUNT *et al.*, 2006; MAYER *et al.*, 2009; JIAO *et al.*, 2011).

A vasta extensão do litoral brasileiro e sua grande plataforma continental abrigam uma biodiversidade oceânica com grande potencial para a descoberta de novos agentes terapêuticos. Porém, o número de pesquisas desenvolvidas com organismos marinhos no Brasil está aquém desta diversidade. Uma revisão de produtos marinhos bioativos com estruturas químicas elucidadas, realizada em 2005-2006, indica a contribuição brasileira com apenas seis compostos – quatro extraídos de algas e dois de esponjas – em um universo de 183 substâncias relacionadas e 32 países envolvidos (MAYER *et al.*, 2009).

Muitos organismos marinhos possuem algum tipo de uso, mesmo sem o conhecimento detalhado de sua composição química e atividades biológicas. Esse é o caso de algas vermelhas calcárias do gênero *Lithothamnion*, utilizadas como suplemento alimentar no país e no exterior. Apesar do seu uso difundido, poucos são os estudos sobre a composição química de espécies deste gênero.

Em trabalho anterior de nosso grupo, Soares (2009) realizou uma avaliação preliminar da composição química da espécie *L. muelleri*, relatando a ocorrência de polissacarídeos sulfatados. Naquele trabalho, a identificação taxonômica foi feita equivocadamente, indicando a espécie como *L. calcareum*. Navarro *et al.* (2011) também isolaram polissacarídeos sulfatados a partir da espécie *L. heterocladum*, sendo que sua composição monossacarídica revelou tratar-se de xilolactanas.

Polissacarídeos sulfatados obtidos de algas possuem importantes atividades biológicas, tais como anticoagulante, antioxidante, antitumoral, antiinflamatória e antiviral (JIAO *et al.*, 2011). Dessa forma, o isolamento de polissacarídeos inéditos tem potencial terapêutico, já que cada uma dessas substâncias possui estrutura única, podendo atuar em diferentes alvos moleculares (COSTA *et al.*, 2010). Porém,

as algas calcárias ainda são pouco estudadas com relação à sua composição polissacarídica.

Considerando que a espécie *Lithothamnion muelleri* tem ocorrência relatada no litoral brasileiro e é comercializada no país como suplemento alimentar, a mesma foi selecionada para estudo no presente trabalho. Esta pesquisa deverá contribuir para o conhecimento da composição química de *L. muelleri* e do potencial farmacológico de seus polissacarídeos sulfatados como agentes antiartríticos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Isolar e realizar a caracterização química de polissacarídeos constituintes da alga vermelha *Lithothamnion muelleri* Lenormand ex Rosanoff, bem como avaliar sua potencial atividade antiartrítica.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Otimizar as condições extrativas para obtenção de polissacarídeos sulfatados de *L. muelleri*.
2. Obter frações enriquecidas em polissacarídeos sulfatados com diferentes características físico-químicas.
3. Submeter as frações obtidas à hidrólise química parcial, visando obter oligossacarídeos.
4. Purificar os principais polissacarídeos constituintes das frações enriquecidas.
5. Avaliar *in vivo* a atividade antiartrítica da alga *L. muelleri* e de suas frações enriquecidas em polissacarídeos.

6. Realizar a caracterização estrutural dos polissacarídeos constituintes de *L. muelleri* por métodos químicos, cromatográficos e espectroscópicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Algas vermelhas calcárias

As algas calcárias (filo Rhodophyta, ordem Corallinales) possuem em comum a capacidade de precipitar carbonato de cálcio e magnésio em suas paredes celulares. Estima-se que 34 gêneros, compreendendo de 300 a 500 espécies, já tenham sido descritos para este grupo (DIAS, 2000). Essas algas são classificadas como articuladas, quando apenas porções do talo algal são calcificadas, ou não articuladas, quando todo o talo é calcificado (FOSTER, 2001).

A identificação inequívoca de espécies de algas vermelhas coralináceas não articuladas é bastante difícil devido à grande similaridade macroscópica entre espécies distintas de um mesmo gênero e, até mesmo, de gêneros diferentes. Uma identificação precisa requer a observação de características vegetativas e reprodutivas típicas de cada espécie. Uma dificuldade adicional aos estudos dessas algas é a ocorrência frequente de mais de uma espécie no mesmo fragmento calcário (HARVEY & WOELKERLING, 2007).

No ambiente marinho, as algas calcárias ocupam diversos habitats, podendo ser encontradas na zona intermarés ou em águas profundas. Porém, é importante considerar que as coralináceas são organismos fotossintéticos e que necessitam de luz para sua sobrevivência. Assim, apenas a película superficial da crosta algálica é viva e possui a coloração avermelhada característica. Na plataforma continental brasileira a ocorrência de algas calcárias é ampla, tendo sido relatada desde a década de 1960 (DIAS, 2000).

Os fragmentos que se desprendem dos depósitos sedimentares de algas calcárias são constituintes dos granulados bioclásticos marinhos, que são usualmente coletados por dragagem. Vários são os setores que utilizam esses granulados, destacando-se as indústrias de cosméticos e de alimentos, a agricultura, e os setores de tratamento de águas e nutrição animal (DIAS, 2000).

As algas calcárias são constituídas basicamente por carbonato de cálcio e magnésio, estando também presentes oligoelementos em quantidades variáveis (DIAS, 2000; BILAN & USOV, 2001). A calcificação é uma estratégia de proteção para as algas coralináceas, porém, dificulta o crescimento desses organismos (BILAN & USOV, 2001; FOSTER, 2001).

2.1.1 O gênero *Lithothamnion* e a espécie *Lithothamnion muelleri*

As algas calcárias do gênero *Lithothamnion* podem ser encontradas na forma fixa ou como rodolitos (estruturas de vida livre compostas, majoritariamente, por algas coralináceas não articuladas) (FOSTER, 2001). Esses rodolitos organizam-se em comunidades (bancos de rodolitos), agregando outras espécies e compondo habitats de grande biodiversidade (FOSTER, 2001).

No Brasil, a plataforma continental contém uma grande diversidade de algas vermelhas calcárias, sendo considerada a área com maior ocorrência de rodolitos do mundo (FOSTER, 2001). Porém, ainda são poucos os estudos sobre as espécies presentes nessas áreas.

A espécie marinha *Lithothamnion muelleri* Lenormand ex Rosanoff (**Figura 2.1**) pertence ao grupo das algas vermelhas (filo Rhodophyta), ordem Corallinales, família Hapalidiaceae (GUIRY & GUIRY, 2010).



Figura 2.1 – Fragmentos calcários da espécie *Lithothamnion muelleri*.

L. muelleri tem ocorrência relatada no litoral do estado do Espírito Santo, tanto em baixas profundidades (entre 4 e 18 m) (AMADO-FILHO *et al.*, 2010), quanto em águas profundas (entre 55 e 58 m) (HENRIQUES *et al.*, 2011). A ocorrência da espécie também já foi descrita na Austrália (WILKS & WOELKERLING, 1995; LUND *et al.*, 2000), Coréia (LEE & KANG, 2001 *apud* AMADO-FILHO *et al.*, 2010), México (YABUR-PACHECO & RIOSMENA-RODRÍGUEZ, 2007; RIVERA *et al.*, 2004; FOSTER *et al.*, 2007) e Chile (RAMÍREZ & SANTELICES, 1991 *apud* AMADO-FILHO *et al.*, 2010).

Estudos focados na investigação da composição química de algas calcárias são escassos. Por outro lado, preparações contendo espécies do gênero *Lithothamnion* são comercializadas em vários países como suplementos alimentares. A presença de elevadas concentrações de cálcio, magnésio e outros elementos endossa a indicação desses produtos como fontes de minerais.

Estudos recentes avaliaram uma gama de atividades biológicas de alguns desses suplementos. Ryan *et al.* (2011) analisaram a atividade antiinflamatória de um extrato mineral derivado da alga *Lithothamnion corallioides* em cultura de células gliais estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS). Os autores relataram o efeito antiinflamatório do extrato, relacionado à redução das concentrações do fator de necrose tumoral (TNF- α) e da interleucina IL-1 β (citocinas pró-inflamatórias). O mesmo extrato foi avaliado em ratas ovariectomizadas com osteoporose pós-menopáusia, sendo observado o bloqueio da reabsorção óssea e a manutenção da estrutura dos ossos dos animais tratados (DO *et al.*, 2007). Efeitos protetores

sobre a estrutura óssea também foram relatados para um suplemento multimineral produzido a partir de *L. calcareum* (ASLAM, KREIDER *et al.*, 2010). Hong *et al.* (2011) demonstraram o efeito hepatoprotetor em animais tratados com um suplemento constituído pelas espécies *Lithothamnion corallioides* e *Phythomalliton calcareum*, sendo o efeito atribuído à atividade antioxidante das espécies.

A supressão do crescimento de células de câncer de cólon humanas, incluindo linhagens resistentes à suplementação com Ca^{2+} , foi demonstrada para a espécie *L. calcareum* (ASLAM *et al.*, 2009). O derivado multimineral desta espécie também apresentou atividade protetora sobre a formação de pólipos no cólon, indicando um possível efeito quimiopreventivo (ASLAM, PARUCHURI *et al.*, 2010). A ação de *L. calcareum* na indução da diferenciação celular em tecido de cólon humano e na modulação da função do estroma também foi observada para um suplemento alimentar constituído pela espécie (DAME *et al.*, 2011).

Um suplemento alimentar produzido a partir de *L. calcareum* foi avaliado em ensaios clínicos. Frestedt *et al.* (2008) analisaram o efeito deste produto no alívio de alguns sintomas da osteoartrite moderada a severa do joelho. Os pacientes tratados com o derivado multimineral por doze semanas apresentaram redução da dor e da rigidez ocasionadas pela artrose. Em outro estudo, o mesmo suplemento melhorou a amplitude de movimento e a distância caminhada por pacientes com osteoartrite, sendo que a retirada parcial dos antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) utilizados como tratamento foi facilitada no grupo que utilizou o produto (FRESTEDT *et al.*, 2009).

Todos esses estudos relacionaram as atividades observadas apenas à composição mineral das espécies em questão, desconsiderando a possível ação de outros componentes químicos.

Estudos centrados no isolamento e caracterização de metabólitos primários e secundários de espécies de *Lithothamnion* são ainda mais raros. Eicosanóides foram isolados do extrato etanólico de uma mistura das algas *L. calcareum* e *L. corallioides* (**Figura 2.2**). Os autores relatam que a atribuição de cada metabólito à

determinada espécie não foi realizada devido a dificuldades para a separação das mesmas (GUERRIERO *et al.*, 1990).

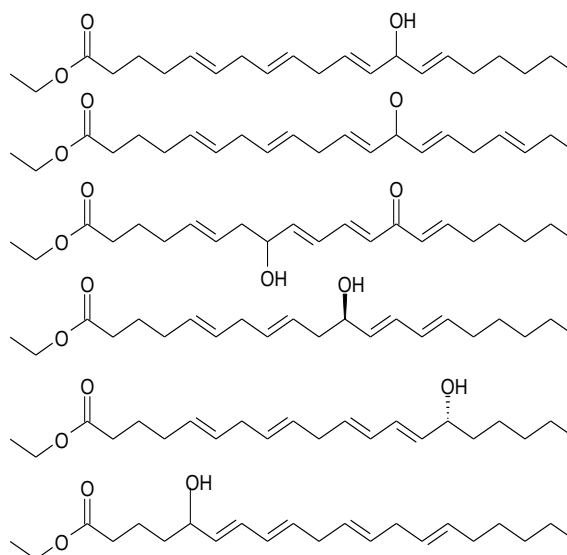


Figura 2.2 – Eicosanóides isolados de mistura de *L. calcareum* e *L. corallioides*.

Soares (2009) relatou a ocorrência de polissacarídeos sulfatados na espécie *L. muelleri* e sua potencial atividade antiinflamatória foi avaliada em modelo *in vivo* de inibição do rolamento de leucócitos. Polissacarídeos sulfatados também foram isolados da espécie *L. heterocladum*, sendo que uma das frações mostrou-se rica em xilogalactanas sulfatadas (NAVARRO *et al.*, 2011).

Devido ao elevado teor de cálcio e outros elementos minerais, a espécie *L. muelleri* é comercializada como suplemento alimentar no Brasil. O produto Vitalidade 50+[®], produzido pela empresa Phosther Algamar Ltda., é indicado para suplementação multimineral. Excetuando-se a avaliação preliminar da composição química de *L. muelleri* realizada por Soares (2009), não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando a composição polissacarídica da espécie. Além disso, a avaliação da atividade antiartrítica da espécie e o papel dos polissacarídeos nessa ação também não foram investigados, o que motivou o presente trabalho.

2.2 Polissacarídeos sulfatados de algas e atividades biológicas

Polissacarídeos são polímeros de elevada massa molecular provenientes da condensação de moléculas de aldoses e cetoses, podendo estar associados a outros grupos químicos (POSER, 2007). Esses compostos são constituintes de todos os organismos vivos, porém diferem largamente em suas constituições (WITVROUW & DE CLERCQ, 1997). Os polissacarídeos sulfatados são polímeros aniônicos de vasta ocorrência na natureza, com ampla gama de atividades biológicas relatadas. As algas marinhas são a principal fonte de polissacarídeos sulfatados de origem não animal (COSTA *et al.*, 2010).

A matriz polissacarídica da parede celular das algas vermelhas é constituída basicamente por galactanas sulfatadas. Estas são polímeros lineares de resíduos alternados de β -galactose em ligação 1 $\rightarrow$ 3 e de α -galactose em ligação 1 $\rightarrow$ 4. O resíduo de β -galactose pertence à série D, enquanto o resíduo de α -galactose pode possuir configuração D (sendo, então, do grupo das carragenanas) ou L (grupo das agaranas). É possível também a ocorrência dos resíduos como derivados anidros 3,6 (**Figura 2.3**) (BILAN & USOV, 2001).

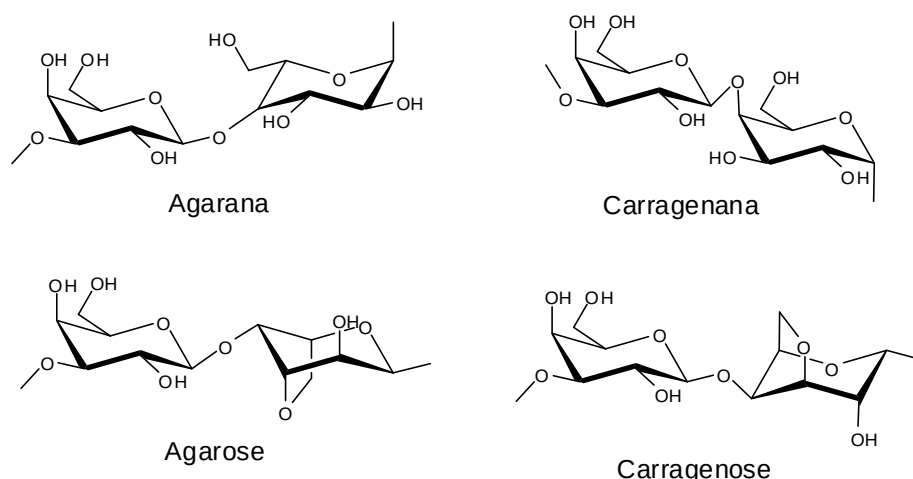


Figura 2.3 – Estruturas básicas dos dissacarídeos característicos dos quatro grupos principais de galactanas encontradas em algas vermelhas.
Fonte: BILAN & USOV, 2001 (adaptado).

A grande variedade estrutural dos polímeros naturais de galactanas está relacionada à presença de substituintes diversos tais como grupos sulfato, metoxila e outros

açúcares, ligados em diferentes posições, conferindo propriedades variadas e uma ampla gama de atividades biológicas aos polissacarídeos (BILAN & USOV, 2001).

As algas vermelhas calcárias da família Corallinaceae possuem composição polissacarídica distinta das demais algas vermelhas. Xilogalactanas sulfatadas foram isoladas das espécies *Corallina pilulifera*, *Bossiella cretacea* e *Clathromorphum nereostratum*, além de ácidos algínicos, isolados das mesmas espécies e de *Amphiroa fragilissima* e *Corallina mediterranea* (BILAN & USOV, 2001). Os ácidos algínicos são os principais polissacarídeos presentes em algas marrons, não sendo característicos de algas vermelhas (DEWICK, 2009). A diferença na composição polissacarídica das algas vermelhas calcárias parece estar relacionada com a ocorrência de calcificação nesses organismos (BILAN & USOV, 2001).

A vasta diversidade estrutural dos polissacarídeos sintetizados por algas está diretamente relacionada às várias atividades biológicas descritas para compostos desta classe. Propriedades antiinflamatória, antioxidante, anticoagulante, antitumoral, antiviral, hipocolesterolemizante, entre outras, foram relatadas para polissacarídeos de diferentes espécies de algas (COSTA *et al.*, 2010; MAYER *et al.*, 2009; WITVROUW & DE CLERQ, 1997; BERTEAU & MULLOY, 2003; GROTH *et al.*, 2009; POSER, 2007; JIAO *et al.*, 2011).

A atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de algas é bastante conhecida, sendo que vários estudos apontam para a possibilidade de que esses compostos constituam uma alternativa ao uso da heparina (origem animal) (BERTEAU & MULLOY, 2003).

Em estudo realizado no Brasil com algas tropicais, sete espécies (*Dictyota cervicornis*, *Dictyopteris delicatula*, *Dictyota mertensii*, *Codium isthmocladum*, *Caulerpa cupressoides*, *Caulerpa prolifera* e *Caulerpa sertularioides*) apresentaram atividade anticoagulante atuando na via intrínseca da cascata de coagulação, avaliada pelo teste de tempo de tromboplastina parcial ativada. A espécie *Caulerpa cupressoides* também foi ativa na via extrínseca, avaliada pelo teste do tempo de protrombina (COSTA *et al.*, 2010).

No mesmo estudo, onze espécies de algas, pertencentes aos filos Phaeophyta, Rhodophyta e Chlorophyta, apresentaram atividade antioxidante, sendo os polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria caudata* os mais ativos (53,9 mg/g em equivalentes de ácido ascórbico) (COSTA *et al.*, 2010).

Adicionalmente, uma fração rica em polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Delesseria sanguinea*, constituída de xilogalactanas sulfatadas, foi testada quanto às suas possíveis atividades anticoagulante, antiinflamatória e antimetastática, mostrando-se ativa em todos os modelos avaliados (GROTH *et al.*, 2009).

A atividade antiinflamatória tópica de polissacarídeos derivados de culturas de microalgas vermelhas do gênero *Porphyridium* foi demonstrada por Matsui *et al.* (2003). Neste estudo foram realizados testes *in vivo*, que demonstraram a capacidade dos polissacarídeos em inibir eritema cutâneo induzido por um agente irritante e também testes *in vitro*, que mostraram a inibição da migração de leucócitos polimorfonucleares e bloqueio parcial da adesão endotelial (MATSUI *et al.*, 2003).

Um dos mecanismos avaliados na atividade antiinflamatória de polissacarídeos é a inibição da migração celular. Diferentes fucanas sulfatadas mostraram atividade antiinflamatória relacionada à redução do extravasamento de leucócitos polimorfonucleares (CUMASHI *et al.*, 2007). Esses polissacarídeos parecem exercer o efeito devido à inibição do rolamento de leucócitos mediado por selectinas (BERTEAU & MULLOY, 2003; CUMASHI *et al.*, 2007; MATSUI *et al.*, 2003). Alguns trabalhos mostram a importância da sulfatação para a interação com selectinas e consequente inibição do rolamento de leucócitos em modelos *in vivo* e *in vitro* (FRITZSCHE *et al.*, 2006; TANGELDER & ARFORS, 1991). Um maior grau de sulfatação está diretamente relacionado a uma maior atividade inibidora do rolamento de leucócitos, enquanto a massa molecular parece não ser um parâmetro importante nesta atividade biológica (FRITZSCHE *et al.*, 2006; TANGELDER & ARFORS, 1991).

As atividades biológicas de polissacarídeos possuem estreita relação com suas estruturas químicas (massa molecular, posição dos grupos substituintes, açúcares

constituintes, grau de sulfatação, carga da molécula, dentre outros fatores), sendo necessário realizar caracterização estrutural para a melhor compreensão de suas atividades biológicas. Porém, devido às dificuldades para caracterização estrutural de polissacarídeos de algas, as relações entre estrutura e atividades biológicas ainda é pouco conhecida.

Farias *et al.* (2000) realizaram a caracterização química e a avaliação da atividade anticoagulante de uma galactana sulfatada da alga vermelha *Botryocladia occidentalis*. Os autores relataram que a atividade anticoagulante depende não apenas do grau de sulfatação (carga aniônica da molécula), mas também da posição dos grupos sulfato e do arranjo tridimensional da molécula, uma vez que a interação dos polissacarídeos sulfatados com fatores de coagulação é estereoespecífica (FARIAS *et al.*, 2000).

Cumashi *et al.* (2007) demonstraram a atividade antiinflamatória de fucanas de nove espécies de algas marrons em modelo *in vivo* de peritonite aguda. A composição química desses polissacarídeos é bastante distinta, inclusive com diferenças da cadeia principal. Essas diferenças mostraram-se menos relevantes para a atividade biológica do que o arranjo tridimensional dos polímeros, dependente das cargas aniônicas e dos substituintes presentes (CUMASHI *et al.*, 2007). A relação entre fatores estruturais e atividades biológicas de galactanas sulfatadas ainda é pouco conhecida. Porém, pode-se afirmar que apenas a densidade de carga não é suficiente para explicar a ampla gama de atividades biológicas, devendo-se considerar também o padrão de substituição e a natureza da cadeia principal do polissacarídeo (POMIN, 2010).

2.3 Artrite reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença de etiologia ainda desconhecida, possivelmente, multifatorial. Fatores genéticos e ambientais estariam diretamente relacionados com o desencadeamento da doença, o qual ocorreria devido a uma resposta autoimune do organismo (LIPSKI, 1998; FIRESTEIN, 2005; FIRESTEIN,

2010). Essa patologia afeta aproximadamente 1% da população adulta mundial, sendo de duas a três vezes mais comum em mulheres (FIRESTEIN, 2010).

Os pacientes acometidos pela artrite reumatóide apresentam redução da qualidade de vida e queda de produtividade, o que está diretamente relacionado às fortes dores, à limitação funcional e à fadiga associadas à doença. Mesmo atividades diárias comuns são afetadas pela dor nas articulações e redução da mobilidade (STRAND & SINGH, 2007). O diagnóstico é baseado em uma série de sinais e sintomas clínicos, auxiliado por exames sorológicos e radiológicos (FIRESTEIN, 2010).

Os objetivos principais do tratamento são a prevenção ou redução do dano às articulações, redução da dor e prevenção de limitação funcional. A cura, com remissão total dos sintomas, apesar de almejada, raramente é alcançada (KWOH *et al.*, 2002; BÉRTOLO, *et al.*, 2009). O Consenso Brasileiro para o Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide (BÉRTOLO, *et al.*, 2009), assim como o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Artrite Reumatóide do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), listam os principais fármacos utilizados no tratamento dessa patologia no país.

A artrite reumatóide constitui uma desordem inflamatória sistêmica e crônica, caracterizada por uma intensa inflamação sinovial em decorrência da proliferação das células sinoviais e da infiltração de neutrófilos, células B, células T e macrófagos na membrana sinovial e nos espaços periarticulares (FIRESTEIN, 2003; FIRESTEIN, 2005; COELHO, 2007). É uma patologia caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva à deformidade e destruição das articulações em decorrência de erosões ósseas e da cartilagem (LIPSKI, 1998).

Dentre os diferentes tipos celulares envolvidos no desenvolvimento da artrite, os neutrófilos ocupam um papel de destaque. Essas células coordenam a resposta inflamatória aguda e possuem também um papel importante na inflamação crônica (KASAMA *et al.*, 2005). A participação fundamental dos neutrófilos no processo inflamatório da artrite reumatóide foi demonstrada em alguns modelos experimentais (WIPKE & ALLEN, 2001).

Várias citocinas e quimiocinas são comumente encontradas no sítio inflamatório das articulações artríticas (ANDREAKOS *et al.*, 2002; FIRESTEIN, 2010). Esses compostos atuam de diversas maneiras no desencadeamento e progressão do processo inflamatório. A indução da expressão de moléculas de adesão, o recrutamento e a ativação de leucócitos, e o estímulo ou inibição da liberação de outras citocinas e quimiocinas são algumas de suas ações (COELHO, 2007; ANDREAKOS *et al.*, 2002).

Diversos fatores quimiotáticos são conhecidos por induzir o recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios. Na artrite reumatóide, as quimiocinas do grupo CXC estão diretamente envolvidas com o recrutamento de neutrófilos, sendo que a inibição dos receptores de quimiocinas CXC (CXCR1 e CXCR2) mostrou-se efetiva em reduzir a migração celular, com consequente melhora da inflamação sinovial (COELHO *et al.*, 2008).

Para uma melhor compreensão da ação dessas quimiocinas é preciso conhecer as etapas envolvidas no recrutamento celular. Inicialmente, há a captura e rolamento dos leucócitos pelo endotélio vascular. A captura é mediada por proteínas da família das selectinas e seus ligantes, o que promove uma aproximação entre os leucócitos e as células endoteliais (TARRANT & PATEL, 2006; COELHO, 2007). Essa interação fraca propicia o rolamento dos leucócitos sobre as células do endotélio. Em seguida, ocorre a ativação de integrinas na superfície do leucócito por fatores quimiotáticos. As integrinas estão normalmente em um estado inativo na superfície de leucócitos, sendo ativadas por quimiocinas. Uma vez ativadas, ocorre a interação com seus respectivos ligantes no endotélio, levando a uma adesão firme dos leucócitos. As quimiocinas são capazes de induzir a ativação de integrinas em diferentes populações leucocitárias, exercendo um controle do recrutamento celular e influenciando diretamente no processo inflamatório (TARRANT & PATEL, 2006). A próxima etapa, denominada *crawling*, consiste no rastejamento dos leucócitos pela parede do vaso. Esse deslocamento é utilizado como um mecanismo para localizar os melhores sítios para a transmigração (MCDONALD *et al.*, 2010; LEY *et al.*, 2007; PHILLIPSON *et al.*, 2006). Por fim, tem-se a etapa de transmigração ou diapedese, quando os leucócitos ultrapassam a barreira endotelial em direção ao tecido. Essa

etapa também é mediada por interações complementares entre moléculas de adesão e seus ligantes, sendo que se destaca a ação da molécula de adesão celular endotelial e plaquetária (PECAM) 1 (TARRANT & PATEL, 2006). O mecanismo de recrutamento de leucócitos através do endotélio está representado na **Figura 2.4**.

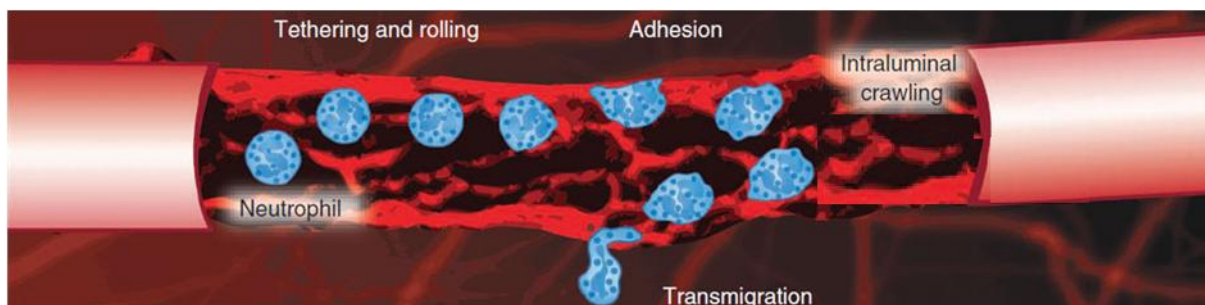


Figura 2.4 – Representação esquemática do processo de migração celular.
 Fonte: PHILLIPSON & KUBES, 2011 (adaptado).

O complexo mecanismo de recrutamento celular que ocorre em processos inflamatórios abrange diferentes etapas que podem ser reguladas, constituindo alvos potenciais para novas alternativas terapêuticas em doenças autoimunes crônicas, como a artrite reumatóide (TARRANT & PATEL, 2006). O uso de modelos animais para o estudo da artrite reumatóide permite uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença e possibilita avaliar novas terapias (KANNAN, *et al.*, 2005).

O tratamento deve ser individualizado, considerando-se o estágio e a gravidade da doença (BÉRTOLO, *et al.*, 2009). A primeira etapa consiste na informação do paciente sobre a patologia e as opções terapêuticas disponíveis. Custos, efeitos adversos, rotina de monitorização e vias de administração são alguns dos itens a serem discutidos (KWOH *et al.*, 2002; BÉRTOLO, *et al.*, 2009). O uso de AINES para o controle sintomático da artrite reumatóide (dor e inflamação) inicia-se nos estágios mais recentes da doença e deve ser aplicado sempre que necessário. Baixas doses sistêmicas de glicocorticóides são usualmente utilizadas nos estágios mais avançados ou em pacientes não responsivos aos AINES (KWOH *et al.*, 2002; BÉRTOLO, *et al.*, 2009). Injeções locais de glicocorticóides também são indicadas em alguns casos (KWOH *et al.*, 2002). Porém, os fármacos antiinflamatórios não devem ser usados como monoterapia, sendo recomendado o uso de drogas

modificadoras do curso da doença (DMCD) desde o momento do diagnóstico (KWOH *et al.*, 2002; BÉRTOLO, *et al.*, 2009; BRASIL, 2002).

As DMCD são aquelas capazes de reduzir ou prevenir o dano às articulações, preservar sua integridade e melhorar a capacidade produtiva do paciente (KWOH *et al.*, 2002). Esse grupo inclui fármacos de diferentes classes terapêuticas, cada um com suas vantagens e desvantagens considerando o custo do tratamento, via de administração, efeitos adversos, contraindicações, rotina de monitorização, dentre outros fatores. A escolha deve ser individualizada e alterações no tratamento devem ser efetuadas sempre que necessário (KWOH *et al.*, 2002; BÉRTOLO, *et al.*, 2009).

Um dos grandes problemas no tratamento da artrite é a ausência de resposta de alguns pacientes, requerendo associação de vários fármacos, sendo frequente a ocorrência de efeitos adversos. Essa constatação deixa clara a necessidade da busca por alternativas terapêuticas, mostrando a carência de opções para o tratamento da doença. Alguns dos fármacos utilizados não possuem mecanismo de ação conhecido, sendo seu uso baseado em observações empíricas, caso da sulfasalazina e de antimaláricos (FIRESTEIN, 2010). O Ministério da Saúde (BRASIL, 2002) lista como DMCD: antimaláricos (hidroxicloroquina ou difosfato de cloroquina), sulfasalazina, metotrexato, leflunomida, imunossupressores (ciclosporina e azatioprina) e infliximabe (inibidor de TNF- α).

Dentre os fármacos atualmente utilizados no tratamento da artrite reumatóide, um destaque deve ser dado às recentes drogas biológicas, destacando-se as terapias anti-citocinas. Dentre essas, pode-se citar os bloqueadores de TNF- α (como etanercepte e infliximabe) e o antagonista do receptor de IL-1 (anakinra) (KWOH *et al.*, 2002). Essas duas citocinas (TNF- α e IL-1) possuem um papel fundamental na fisiopatologia da artrite reumatóide, estando diretamente envolvidas na cascata de citocinas que ocorre na doença, com consequente ativação celular. Além disso, possuem um papel importante na degradação das cartilagens, principalmente pela ativação de genes de metaloproteinases (FIRESTEIN, 2010).

Bloqueadores de TNF- α e IL-1 foram desenvolvidos por via biotecnológica e vem apresentando bons resultados na terapêutica da artrite reumatóide, sendo

considerados como o tratamento do futuro para esta doença. Porém, eles têm custo elevadíssimo e apresentam inconvenientes, como administração por via parenteral, ausência de resposta de alguns pacientes, e graves reações adversas, principalmente aquelas relacionadas ao bloqueio do papel biológico dessas citocinas no controle de infecções (KWOH *et al.*, 2002). Assim, é importante reconhecer o papel inovador dessas terapias, que orientaram a pesquisa em artrite reumatóide para o estudo de novos alvos moleculares, porém, deve-se buscar novas alternativas terapêuticas que não apresentem os inconvenientes anteriormente mencionados.

A descoberta de novas substâncias com boa atividade antiinflamatória e reduzida toxicidade pode auxiliar na redução da morbidade da artrite reumatóide. A busca por novas alternativas terapêuticas está diretamente relacionada à compreensão detalhada da fisiopatologia da doença, o que permite descobrir novos alvos moleculares potenciais.

Dentre os alvos atualmente estudados na busca de novos agentes terapêuticos para esta doença destaca-se o processo de migração celular. Inibidores do rolamento e/ou adesão de leucócitos no endotélio vascular, com consequente redução do exsudato inflamatório nas articulações artríticas, vem ganhando destaque. A inibição da migração celular está diretamente relacionada a menores danos no tecido periarticular, uma vez que o processo de liberação de mediadores inflamatórios estará reduzido. Neste contexto pode-se destacar a promissora atividade apresentada por alguns polissacarídeos como inibidores do rolamento e/ou adesão celulares (TANGELDER & ARFORS, 1991; BERTEAU & MULLOY, 2003; FRITZSCHE *et al.*, 2006; CUMASHI *et al.*, 2007).

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos

- Agitador de tubos FANEM, modelo 251.
- Chapas de aquecimento e agitação magnética Corning, modelos PC-320 e PC-420.
- Anestesiômetro eletrônico, Insight Equipamentos.
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo AB 204.
- Balança analítica Denver Instrument, modelo PI225D.
- Balança semi-analítica Núcleo Equipamentos, modelo PR-1000 NW.
- Banho seco com agitação Mixing Block, BIOER, modelo MB-101.
- Bomba peristáltica Pharmacia, modelo P-1.
- Câmara com luz ultravioleta (UV) ($\lambda=365$ nm) para visualização de placas de cromatografia em camada delgada, Prodicil.
- Câmara de Neubauer.
- Câmera digital PowerShot A620, Canon.
- Centrífuga Hermle, modelo Z323K.
- Cytospin, Shandon Lipshaw Inc.
- Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de chamas Hewlett Packard 5890 – Packard Series II HP, e a sistema de processamento de dados Varian Star # 1 (Laboratório de Cromatografia, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais – DQ, ICEX, UFMG).
- Destilador de água Biopar com capacidade para 5 L/h.
- Espectrofotômetro no infravermelho Perkin-Elmer FT-IR, modelo Spectrum One (Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia – FAFAR, UFMG).
- Espectrofotômetro no ultravioleta/visível (UV/VIS) Hitachi, modelo U-2900.

- Espectrômetro de emissão atômica com plasma induzido Spectro Circus CCD (Laboratório de Análise Elementar da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – IQ, USP).
- Estufa ventilada FANEM, modelo 315 SE.
- Lavadoras ultrassônicas Unique (modelo USC 1400) e Thornton (modelo T50).
- Leitor de microplacas Tecan, modelo Infinite M200 Pro.
- Leitora de microplaca Thermo-Plate, modelo TP-reader.
- Medidor de pH Metrohm, modelo 827 pH lab.
- Microcentrífuga Cientec, modelo 14000D.
- Micropipeta monocal Discovery Comfort, volume ajustável de 100-1000 µL, modelo DV1000.
- Micropipeta monocal Labmate Soft, volume ajustável de 10-100 µL, High Tech Lab, modelo LM100.
- Micropipetas monocal Transferpette S digital, Brand, volume ajustável de 10-100 µL e 100-1000 µL.
- Micropipetas multicanal Transferpette-8 electronic, Brand, volume ajustável de 10-200 µL e 5-100 µL.
- Microscópio óptico, Axioskop 40, Carl Zeiss.
- Micrótomo RM2125RT, Leica.
- Refrigerador Frost Free Electrolux, modelo DF47.
- Sistema de concentração a vácuo Centrivap, Labconco, modelo A50.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Waters, equipado com injetor automático 2695, detector de arranjos de diodos (DAD) 2996, bomba L-6200A e programa Empower 2 para processamento de dados.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em escala preparativa Shimadzu, composto de injetor manual, bomba quaternária LC-8A, controlador de sistema SCL-8A, detector de índice de refração RID-6A e integrador C-R4A.
- Sistema de evaporação Büchi, composto de banho de água termostaticado (modelo B-480), evaporador rotatório (modelo R-114) e bomba de vácuo (modelo V-700) acoplada a controlador de vácuo (modelo V-850).
- Sistema de purificação de água Millipore, modelo Direct-Q 3.
- Soprador térmico serigráfico Steinell, modelo HL-500.

3.2 Solventes e reagentes

- Acetona para análise (P.A.), Fmaia.
- Ácido acético glacial P.A., Merck.
- Ácido clorídrico P.A., Fmaia.
- Ácido d-glicurônico, pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich.
- Ácido *o*-fosfórico P.A., Merck.
- Ácido sulfâmico, Sigma Aldrich.
- Ácido sulfúrico P.A., Fmaia.
- Ácido tricloroacético (TCA), Sigma Aldrich.
- Ácido trifluoroacético (TFA), Sigma Aldrich.
- Albumina de soro bovino (BSA), pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich.
- Albumina de soro bovino metilada (mBSA), pureza $\geq 98\%$, Sigma Aldrich.
- Álcool *n*-butílico P.A., Labsynth.
- Álcool etílico absoluto, P.A., Fmaia.
- Álcool etílico 95%, Fmaia.
- Álcool metílico P.A., Fmaia.
- Anidrido acético, Sigma Aldrich.
- Anilina P.A., Merck.
- Arabinose L (+) para síntese (P.S.), VETEC.
- Azida sódica P.A., Labsynth
- Biftalato de potássio P.A., Grupo Química.
- Boroidreto de sódio, Sigma Aldrich.
- Carbonato de sódio anidro P.A., Fmaia.
- Cloreto de bário P.A., Cromato Produtos Químicos.
- Clorofórmio (CHCl_3) P.A., Fmaia.
- Corante azul brilhante de Coomassie G 250, Sigma Aldrich.
- Diclorometano P.A., Fmaia.
- D-xilose, Difco.
- Fenol P.A., Labsynth.
- Galactose D (+), pureza $\geq 98\%$, VETEC.

- Gelatina Bacto, Difco.
- Glicose D anidra, P.A., Labsynth.
- Hidróxido de potássio P.A. em pó, Vetec.
- Hidróxido de sódio P.A. em pérolas, Fmaia.
- Hidróxido de amônio P.A., Merck.
- *m*-hidroxidifenil, Sigma Aldrich.
- Manose D (+) P.A., Vetec.
- Nitrato de sódio P.A., Proquímios.
- Padrões de pululanas P-82, de 5 a 800 kDa, Shodex Standards.
- Piridina (Py) anidra, Sigma Aldrich.
- Ramnose monoidratada L (+), pureza $\geq 99\%$, VETEC.
- Sephadex G-100 médio (40-120 μm), Sigma Aldrich.
- Sulfato de potássio P.A., Merck.
- Tetraborato de sódio, Sigma Aldrich.

3.3 Materiais de consumo

- Balões volumétricos calibrados, com rolha, de 1,0 mL, Satelit, e de 5,0 e 10,0 mL, Normax.
- Barras magnéticas diversas.
- Coluna Ultrahydrogel Linear (300 $\times$ 7,8 mm d.i.), com pré-coluna Ultrahydrogel Linear, Waters.
- Colunas cromatográficas de vidro 25 $\times$ 3 cm d.i., 37 $\times$ 3 cm d.i. e 45 $\times$ 3 cm d.i.
- Coluna capilar BP-10 (25 m $\times$ 0,25 mm), SGE.
- Cromatofolhas de alumínio recobertas por celulose, 20 $\times$ 20 cm, Merck.
- Cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm.
- Espátulas diversas.
- Frascos de penicilina com tampa de borracha.
- Frascos de vidro com tampa de 5,0 e 10,0 mL, Tedia.
- Kits de ELISA para camundongos, modelo DuoSet, R&D Systems.

- Membrana de celulose para diálise, 33 mm, *cut off* de 10.000 Da, Sigma-Aldrich.
- Papel de filtro qualitativo.
- Papel indicador de pH Universal, pH 0-14, Merck.
- Placa de 96 poços, fundo plano, com tampa, TPP.
- Ponteiras universais, 1-200 µL e 100-1000 µL, Axygen Scientific Inc.
- Seringas descartáveis com agulha, de 1 mL, Descarpack e de 10 mL, Injex.
- Termômetro 10-360°C, Incoterm.
- Tubo para microcentrifugação graduado, 2,0 mL, Axygen Scientific Inc.
- Tubos para centrifugação de 15 e 50 mL, fundo cônico, TPP.
- *Vials* de vidro com tampa e septos de teflon para injetor automático em sistema de CLAE.

3.4 Material ficológico

A alga *Lithothamnion muelleri* Lenormand ex Rosanoff foi fornecida pela empresa Phosther Algamar Ltda. A espécie foi coletada no litoral do estado do Espírito Santo e identificada pela doutora Maria Carolina M. de O. Henriques, do Instituto Biodiversidade Marinha, do Rio de Janeiro. O material foi fornecido na forma de um granulado, denominado “concentrado mineral marinho”. De acordo com informações do fornecedor, a alga foi lavada sequencialmente com água de torneira e água destilada para a remoção de sal e epífitas. Em seguida, o material foi triturado em moinho de bolas e seco em estufa ventilada (37 °C), originando o granulado utilizado no presente estudo.

3.4.1 Análise da composição mineral do granulado de *L. muelleri*

Procedeu-se à análise da presença dos elementos Al, Ca, Cu, Fe, Mg e Zn por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivo de argônio (ICP-AES) no

concentrado mineral marinho. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Elementar da Central Analítica do IQ, USP.

O método consiste em utilizar o plasma gerado a partir do argônio para atomizar e ionizar os constituintes da amostra. Cada elemento ionizado é capaz de emitir energia na forma de luz em uma determinada região do espectro. Como a intensidade de energia emitida é proporcional à concentração do elemento, é possível detectar e quantificar os minerais presentes na amostra.

3.5 Preparo dos extratos

3.5.1 Extração aquosa seguida de extrações alcalinas

O processo de extração aquosa seguido de extrações alcalinas foi realizado segundo descrito por Soares (2009). O material ficológico, na forma de granulado, foi submetido à extração aquosa a 60 °C, sob agitação mecânica, por seis horas, utilizando-se uma relação sólido/solvente extrator (água destilada) de 5% m/v. Após resfriamento, efetuou-se filtração a vácuo e o extrato aquoso (denominado LAQ) foi concentrado em evaporador rotatório a 50 °C, sob pressão reduzida, até aproximadamente 5% do volume inicial.

A torta resultante foi utilizada para extração básica subsequente, com solução aquosa de Na_2CO_3 a 1% m/v, a 60 °C, sob agitação mecânica, por duas horas. A relação torta/solvente extrator foi de 20% m/v. Após resfriamento, efetuou-se nova filtração a vácuo e o extrato obtido (denominado LAB1) foi concentrado em evaporador rotatório a 50 °C, sob pressão reduzida, até aproximadamente 10% do volume inicial.

A partir da torta resultante da primeira extração básica, efetuou-se nova extração alcalina, seguindo-se as mesmas condições acima descritas, porém utilizando solução aquosa de Na_2CO_3 a 2% m/v. O extrato obtido (denominado LAB2) foi

concentrado em evaporador rotatório a 50 °C, sob pressão reduzida, até aproximadamente 10% do volume inicial.

Os extratos concentrados obtidos foram utilizados para obtenção das frações enriquecidas em polissacarídeos, denominadas AQ, AB1 e AB2 conforme descrito no item 3.6.

O processo extrativo foi repetido três vezes para obtenção de massa adicional e análise estatística (**Figura 3.1**).

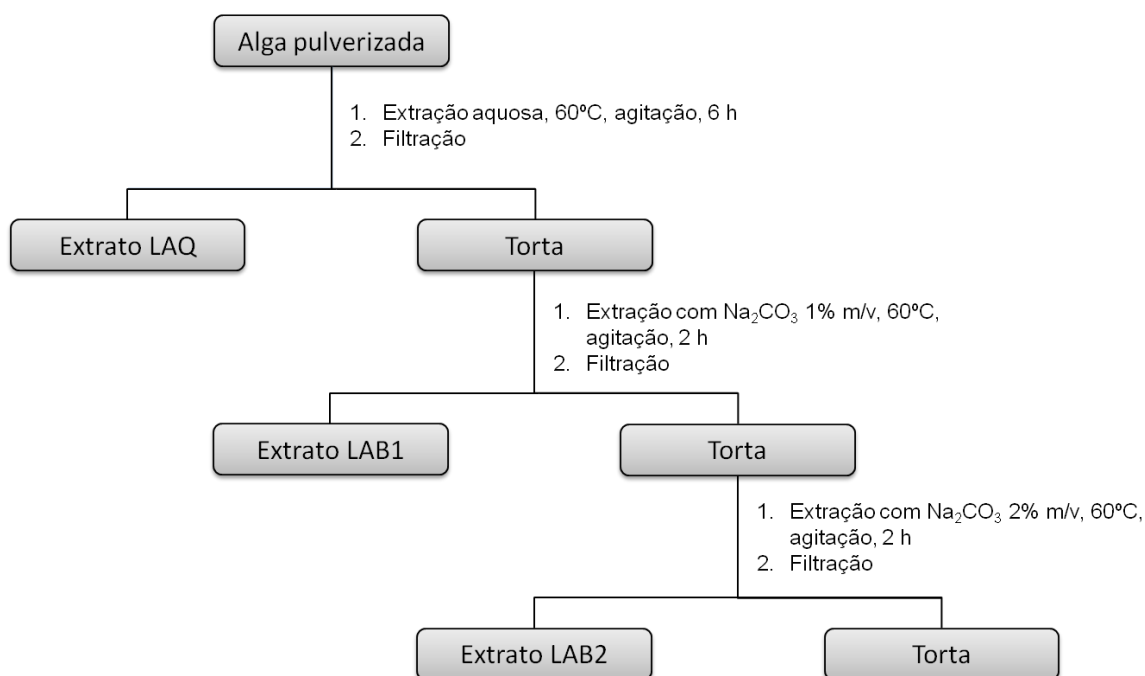


Figura 3.1 – Representação esquemática do processo de extração aquosa seguida de extrações alcalinas de *L. muelleri*.

3.5.2 Extrações alcalinas subsequentes

Tendo em vista o baixo rendimento da fração enriquecida em polissacarídeos obtida a partir do extrato LAQ e também visando simplificar o processo, optou-se por eliminar a etapa de extração aquosa. Assim, o material ficológico na forma de pó granulado foi submetido diretamente à extração com solução aquosa de Na₂CO₃ a

1% m/v, a 60 °C, sob agitação mecânica. Foram avaliados diferentes períodos de extração (1 h, 2 h, 4 h, 6 h). A relação torta/solvente extrator foi de 20% m/v. Após resfriamento, efetuou-se uma filtração a vácuo e o extrato obtido (denominado LB1) foi concentrado em evaporador rotatório a 50 °C, sob pressão reduzida, até aproximadamente 10% do volume inicial.

A torta resultante da primeira extração básica foi novamente extraída com solução aquosa de Na_2CO_3 a 2% m/v, a 60 °C, sob agitação mecânica. Diferentes tempos de extração (1 h, 2 h, 4 h, 6 h) também foram avaliados nesta etapa. A relação torta/solvente extrator foi de 20% m/v. Após resfriamento, efetuou-se uma filtração a vácuo e o extrato obtido (denominado LB2) foi concentrado em evaporador rotatório a 50 °C, sob pressão reduzida, até aproximadamente 10% do volume inicial.

Os extratos concentrados foram empregados para obtenção das frações enriquecidas em polissacarídeos denominadas B1 e B2 (conforme descrito no item 3.6).

O processo extrativo foi repetido diversas vezes para obtenção de massa adicional e está representado na **Figura 3.2**.



Figura 3.2 – Representação esquemática do processo de extrações alcalinas sequenciais de *L. muelleri*.

3.6 Obtenção das frações enriquecidas em polissacarídeos

Os extratos concentrados obtidos (itens 3.5.1 e 3.5.2) foram precipitados com etanol 95% v/v. Para tanto, utilizou-se a proporção de quatro volumes de etanol para um volume da solução aquosa, seguindo-se agitação com bastão de vidro até a formação de um precipitado branco. A seguir, a suspensão foi centrifugada a 3.000 r.p.m., por 10 min, à temperatura ambiente. O precipitado foi recolhido, ressuspensado em etanol e centrifugado novamente por três vezes. Ao fim do processo, ressuspendeu-se o precipitado obtido em água destilada e procedeu-se a diálise em membrana de celulose com valor de exclusão (*cut off*) de aproximadamente 10.000 Da. A eliminação do carbonato residual das extrações alcalinas foi monitorada pela avaliação periódica do pH da água de diálise, utilizando papel indicador universal. O emprego de acetona para precipitação dos extratos também foi avaliado, utilizando-se as mesmas condições (CUI, 2005). O dialisado foi seco sob pressão reduzida à temperatura máxima de 50 °C. A obtenção das frações está representada de forma esquemática no fluxograma da **Figura 3.3**.

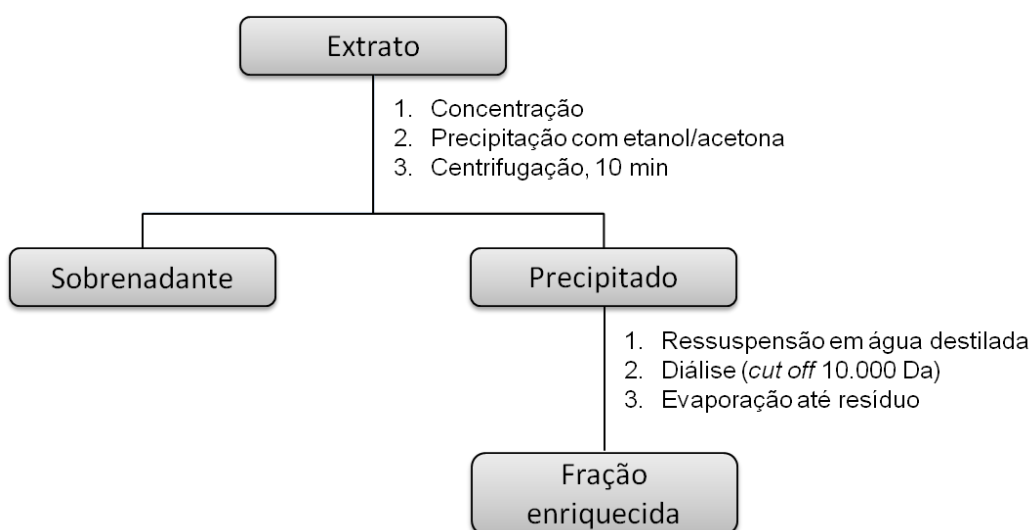


Figura 3.3 – Representação esquemática dos procedimentos utilizados para a obtenção das frações enriquecidas em polissacarídeos.

3.7 Análise das frações enriquecidas em polissacarídeos por cromatografia em camada delgada

3.7.1 Hidrólise ácida total

Previamente às análises, as frações enriquecidas em polissacarídeos B1 e B2 foram submetidas à hidrólise ácida total. Para tanto, utilizou-se 10 mg da amostra e 5,0 mL de TFA 2 M sob refluxo a 110 °C, por seis horas. Após este período, 2,0 mL de metanol foram adicionados à solução previamente resfriada e o hidrolisado foi concentrado para análise por cromatografia em camada delgada (CCD) (ZHANG *et al.*, 2008).

3.7.2 Cromatografia em camada delgada

Foram utilizadas placas de celulose como fase estacionária e mistura de *n*-butanol (*n*-BuOH), acetato de etila (EtOAc), piridina (Py) e água na proporção de 6:1:5:4 v/v como eluente (ZHANG *et al.*, 2008). Empregou-se anilina-ácido ftálico como revelador, preparado a partir da dissolução de 1,66 g de ácido ftálico em 50,0 mL de água saturada com *n*-butanol, contendo 0,9 mL de anilina (JORK *et al.*, 1990). As manchas foram detectadas após borrifar a placa com o revelador e aquecê-la. Os cromatogramas foram observados sob luz visível e UV ($\lambda=365$ nm), antes e após a revelação.

Foram utilizados sete açúcares como substâncias de referência: glicose, galactose, manose, ramnose, xilose, arabinose e ácido glicurônico. Foram preparadas soluções padrão contendo 1 mg da substância solubilizado em 100 μ L de água destilada, com posterior adição de 900 μ L de metanol. Destas soluções, 10 μ L foram aplicados à placa (ADAM & BECKER, 2000).

3.8 Fracionamentos cromatográficos

Para o fracionamento de B1 e B2, utilizou-se cromatografia de filtração molecular em Sephadex G-100. A eluição foi realizada com água destilada, tendo sido recolhidas frações de 5 mL.

3.8.1 Preparo das amostras

Porções de 150,0 mg das frações enriquecidas em polissacarídeos B1 e B2 foram utilizadas para os fracionamentos cromatográficos. Anteriormente a todas as separações, o material seco e na forma de pó foi solubilizado em água destilada com agitação manual, seguindo-se centrifugação a 10.000 r.p.m., por 10 min. O sobrenadante foi aplicado no topo da coluna cromatográfica.

3.8.2 Monitoramento

As separações cromatográficas foram monitoradas por reação colorimétrica de fenol-ácido sulfúrico para detecção de açúcares totais, empregando o método adaptado para microplaca (MASUKO *et al.*, 2005), conforme descrito no item 3.10.3. Alíquotas de 50 µL das frações recolhidas da coluna foram utilizadas para a reação. Como resultado do monitoramento foi construído um gráfico relacionando a absorvância de cada fração no comprimento de onda de 490 nm com o número sequencial das mesmas. As frações foram reunidas de acordo com a semelhança dos perfis identificados no monitoramento e secas sob pressão reduzida e temperatura máxima de 50 °C.

3.8.3 Fracionamento de B1

Vários fracionamentos foram efetuados com porções de B1 até que as melhores condições para a separação fossem alcançadas. Inicialmente utilizou-se 15,0 mL de água destilada para a solubilização de 150,0 mg de B1, seguindo-se o fracionamento em coluna de Sephadex G-100 (45 × 3 cm d.i.). Visando aperfeiçoar o processo de separação cromatográfica, reduziu-se o volume de água destilada necessário para a solubilização de B1 (150 mg) para 10,0 mL. Verificou-se que não houve perda adicional significativa de material na centrifugação e, a partir daí, adotou-se o volume de 10,0 mL de água destilada para a solubilização de novas amostras. Devido ao longo tempo (16 h) demandado na separação cromatográfica em coluna por gravidade, buscou-se como alternativa um sistema de coluna com controle de fluxo. Efetuou-se, então, um novo fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex G-100 (30 × 2,5 cm d.i.) com fluxo de 0,5 mL/min de água destilada, utilizando-se 100 mg de B1. Houve redução significativa do tempo de análise (6 h). Assim, a última alteração efetuada foi o aumento do comprimento da coluna de Sephadex G-100, passando de 30 cm para 70 cm. O fluxo do eluente foi aumentado para 0,8 mL/min objetivando evitar um tempo de análise muito longo. Devido à melhora da separação indicada pelo monitoramento, adotou-se essa condição como padrão, utilizando-se porções de 150 mg de B1. As frações de perfis similares dos primeiros fracionamentos e que apresentavam massa significativa foram reunidas e refracionadas utilizando essa condição.

3.8.4 Fracionamento de B2

O fracionamento de B2 foi efetuado em coluna de Sephadex G-100 (70 × 2,5 cm d.i.), com fluxo de 0,8 mL/min. Uma porção de 150,0 mg de B2 foi solubilizada em 10,0 mL de água destilada previamente ao fracionamento.

3.9 Perfis cromatográficos por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho

Para a análise das amostras por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho (HPSEC) utilizou-se uma coluna de filtração molecular Ultrahydrogel Linear (300 × 7,8 mm d.i., Waters), com eluição isocrática de água ultrapura e fluxo de 0,6 mL/min, à temperatura ambiente. A detecção foi feita no UV ($\lambda=210$ nm), sendo os espectros de cada pico registrados na faixa de comprimentos de onda de 190 a 500 nm pelo detector.

Soluções aquosas de concentração 5,0 mg/mL das amostras foram preparadas para a análise dos perfis cromatográficos. Após a completa solubilização, as soluções foram centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para *vials* de vidro e alíquotas de 10 μ L foram injetadas de forma automática no sistema de CLAE.

3.10 Caracterização estrutural dos polissacarídeos

3.10.1 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR, à temperatura ambiente, entre 4.000 e 650 cm^{-1} , no Laboratório de Química Farmacêutica da FAFAR, UFMG.

3.10.2 Espectroscopia no ultravioleta/visível

Os espectros foram registrados em leitor de microplacas (Tecan, modelo Infinite M200 Pro), realizando-se varredura entre os comprimentos de onda de 230 a 800

nm. Foram empregadas microplacas de 96 poços. As amostras foram solubilizadas em água, na concentração de 1,5 mg/mL e procedeu-se a reação colorimétrica de fenol-ácido sulfúrico (MASUKO *et al.*, 2005). A 50 µL da solução amostra foram adicionados 150 µL de H₂SO₄ concentrado, seguidos de 30 µL de solução aquosa de fenol a 5% m/v. A microplaca foi mantida a 90 °C em banho seco, por cinco minutos. Em seguida, a microplaca foi imersa em banho de água à temperatura ambiente por cinco minutos para resfriamento. A leitura foi realizada em sequência. Foram traçados os espectros no UV/VIS para B1, B2, Fra B1 e Fra B2.

3.10.3 Quantificação de açúcares totais

A quantificação de açúcares totais nas frações de *L. muelleri* foi realizada de acordo com o método descrito por Dubois *et al.* (1956), com adaptações para microplaca (MASUKO *et al.*, 2005).

Para a construção da curva de calibração foi preparada uma solução de galactose (1,5 mg/mL) solubilizando-se 7,5 mg do açúcar em 5,0 mL de água destilada. Alíquotas de 50, 40, 30, 20 e 10 µL dessa solução foram transferidas para poços de uma microplaca com 96 poços, sendo todos os volumes ajustados para 50 µL com água destilada, correspondendo a soluções de 1,5, 1,2, 0,9, 0,6 e 0,3 mg/mL, respectivamente. Como branco utilizou-se 50 µL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 150 µL de H₂SO₄ concentrado e 30 µL de solução aquosa de fenol a 5% m/v a cada um dos poços. A microplaca foi submetida a aquecimento a 90 °C em banho seco, seguindo-se resfriamento em banho de água à temperatura ambiente. As absorvâncias foram determinadas no λ de 490 nm em leitor de microplacas e utilizadas, após descontar-se o valor do branco, para a construção da curva analítica (MASUKO *et al.*, 2005).

De acordo com o processo descrito acima, foram construídas três curvas em dias diferentes. As soluções de galactose foram preparadas nos dias dos ensaios. Realizou-se a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para cada curva, obtendo-se os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes. As

curvas foram comparadas estatisticamente por análise de covariância e, após comprovada a ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), uma curva média resultante foi obtida. O programa GraphPad Prism versão 5 (2007) foi utilizado para as análises estatísticas.

Anteriormente à quantificação das amostras, foram traçados espectros de varredura na região de λ de 230 a 800 nm para as soluções de leitura com e sem a adição dos reagentes. O objetivo dessa análise é avaliar se as amostras interferem na leitura de absorvância em $\lambda = 490$ nm. As soluções de leitura sem a adição dos reagentes não devem apresentar absorção significativa nesse comprimento de onda.

As amostras foram quantificadas a partir do preparo de soluções aquosas de concentração 1,5 mg/mL preparadas em balões volumétricos de 1,0 mL. Água destilada foi utilizada como branco. Alíquotas de 50 μ L de cada solução e do branco foram, então, transferidas para poços de uma microplaca, seguindo-se a adição dos reagentes (conforme descrito para o padrão de galactose). As absorvâncias foram determinadas em $\lambda = 490$ nm em leitor de microplacas e utilizadas, após descontar-se o valor do branco, para a determinação dos teores de açúcares totais.

Os teores percentuais foram calculados a partir do fator de resposta, obtido pela análise de solução padrão de galactose na concentração de 0,9 mg/mL ($n = 3$), em cada dia de análise. Os cálculos foram realizados no programa Microsoft Office Excel (2007), sendo os resultados expressos em termos percentuais $\pm$ desvio padrão (DP) ($n = 3$).

3.10.4 Quantificação de sulfato

A quantificação de sulfato nas frações de *L. muelleri* foi realizada de acordo com o método descrito por Dodgson (1961) e Dodgson & Price (1962).

Para a construção da curva de calibração foi preparada uma solução de K_2SO_4 (1,0 mg/mL de SO_4^{2-}), solubilizando-se 18,1 mg desse reagente em água destilada. O

volume foi aferido com o mesmo solvente em um balão volumétrico de 10,0 mL. Alíquotas de 20, 40, 80, 120 e 200 µL dessa solução foram transferidas para tubos de ensaio, sendo todos os volumes ajustados para 200 µL com água destilada, correspondendo a soluções de 20, 40, 80, 120 e 200 µg de SO_4^{2-} em 200 µL, respectivamente. Como branco utilizou-se 200 µL de água destilada. Em seguida, adicionaram-se 3,8 mL de ácido tricloroacético a 4% v/v e 1,0 mL do reagente gelatina/cloreto de bário. Após agitação em vórtex, aguardou-se 20 min para a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 500 nm em espectrofotômetro de UV/VIS. Foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores obtidos foram utilizados para a construção da curva analítica (DODGSON, 1961; DODGSON & PRICE, 1962).

Utilizando o protocolo descrito acima, foram construídas três curvas em dias diferentes. As soluções de sulfato de potássio foram preparadas nos dias dos ensaios. Foi realizada a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para cada curva, obtendo-se os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes. As curvas foram comparadas estatisticamente por análise de covariância e, após comprovada a ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), uma curva média resultante foi obtida. O programa GraphPad Prism versão 5 (2007) foi utilizado para as análises estatísticas.

Anteriormente à quantificação das amostras, foram traçados espectros de varredura na região de λ de 200 a 800 nm para as soluções de leitura com e sem a adição dos reagentes. O objetivo dessa análise é avaliar se as amostras interferem na leitura da absorvância em $\lambda = 500$ nm. As soluções de leitura sem a adição dos reagentes não devem apresentar absorção significativa neste comprimento de onda.

Para a quantificação das amostras, 4,0 mg de cada fração foram solubilizados em 2,0 mL de solução aquosa de HCl 2 M. Essas soluções foram submetidas a aquecimento a 105-110 °C em estufa, em frascos vedados, por cinco horas (DODGSON & PRICE, 1962). Após esse período, devido à possível variação de volume e, conseqüentemente, de concentração, as soluções foram secas até resíduo sob fluxo de ar comprimido. Em seguida, 2,0 mL de água destilada foram adicionados a cada frasco, perfazendo soluções de concentração 2,0 mg/mL. Água

destilada foi utilizada como branco. Alíquotas de 200 µL de cada solução e do branco foram, então, transferidas para tubos de ensaio, seguindo-se a adição dos reagentes (conforme descrito para o padrão de sulfato de potássio). As absorvâncias foram determinadas no comprimento de onda de 500 nm em espectrofotômetro de UV/VIS, em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores obtidos foram utilizados para a determinação dos teores de sulfato em cada amostra.

Os teores percentuais foram calculados a partir do fator de resposta, obtido pela análise de solução padrão de sulfato de potássio contendo 80 µg de íons SO_4^{2-} em 200 µL ($n = 3$), em cada dia de análise. Os cálculos foram realizados no programa Microsoft Office Excel (2007), sendo os resultados expressos em termos percentuais $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

3.10.5 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais nas frações de *L. muelleri* foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), com adaptações para microplaca (ZOR & SELINGER, 1996; KRUGER, 2002).

Para a construção da curva de calibração foi preparada uma solução de albumina de soro bovino (1,0 mg/mL) solubilizando-se 1,0 mg do padrão em água destilada (1,0 mL). Em seguida, 100 µL dessa solução foram transferidos para balão volumétrico de 1,0 mL, sendo o volume completado com água destilada, obtendo-se uma solução com concentração final de 0,1 mg/mL. Alíquotas de 10, 20, 30, 40 e 50 µL dessa solução foram transferidas para poços de uma microplaca com 96 poços, sendo todos os volumes ajustados para 50 µL com água destilada, correspondendo a soluções de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 µg de albumina em 50 µL, respectivamente. Como branco utilizou-se 50 µL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 200 µL do reagente contendo o corante Coomassie Brilliant Blue G-250. Após cinco minutos, as absorvâncias foram determinadas no comprimento de onda de 595 nm em leitor de microplacas, sendo os valores utilizados, após descontar-se o valor do branco, para a construção da curva analítica (ZOR & SELINGER, 1996; KRUGER, 2002).

De acordo com o protocolo descrito acima, foram construídas três curvas em dias diferentes. As soluções de BSA foram preparadas nos dias dos ensaios. A análise de regressão linear foi realizada pelo método dos mínimos quadrados para cada curva, obtendo-se os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes. As curvas foram comparadas estatisticamente por análise de covariância e, após comprovada a ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), uma curva média resultante foi obtida. O programa GraphPad Prism versão 5 (2007) foi utilizado para as análises estatísticas.

Anteriormente à quantificação das amostras, foram traçados espectros de varredura na região de λ de 230 a 800 nm para as soluções de leitura com e sem a adição dos reagentes. O objetivo dessa análise é avaliar se as amostras interferem na leitura de absorvância no comprimento de onda de 595 nm. As soluções de leitura sem a adição dos reagentes não devem apresentar absorção significativa nesse comprimento de onda.

As amostras foram quantificadas a partir do preparo de soluções aquosas com concentração de 2,0 mg/mL. Água destilada foi utilizada como branco. Alíquotas de 50 μ L de cada solução e do branco foram, então, transferidas para poços de uma microplaca, seguindo-se a adição do reagente (conforme descrito para o padrão de BSA). As absorvâncias foram determinadas no λ de 595 nm em leitor de microplacas, sendo os valores empregados para determinar os teores de proteínas totais, após descontar-se o valor do branco.

Os teores percentuais foram calculados a partir do fator de resposta, obtido pela análise de solução padrão de BSA contendo 3 μ g de proteína em 50 μ L ($n = 3$), no dia das quantificações. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Microsoft Office Excel (2007), sendo os resultados expressos em termos percentuais $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

3.10.6 Quantificação de ácidos urônicos

A quantificação de ácidos urônicos presentes nas frações de *L. muelleri* foi realizada pelo método descrito por Filisetti-Cozzi & Carpita (1991).

A curva de calibração foi construída a partir do preparo de uma solução de ácido glicurônico (1,0 mg/mL) solubilizando-se 5,0 mg do padrão em água destilada (5,0 mL). Em seguida, 900 µL dessa solução foram transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL, sendo o volume completado com água destilada, obtendo-se uma solução com concentração de 0,09 mg/mL. Alíquotas de 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µL da solução de ácido glicurônico a 0,09 mg/mL foram transferidas para tubos de ensaio, sendo os volumes ajustados para 400 µL com água destilada, correspondendo a soluções com 9; 13,5; 18; 22,5; 27 e 31,5 µg de ácido glicurônico em 400 µL, respectivamente. Como branco utilizou-se 400 µL de água destilada.

Para o ensaio, adicionou-se 40 µL de uma solução 4 M de ácido sulfâmico/sulfamato de potássio (pH 1,6), seguindo-se agitação vigorosa dos tubos em vórtex. Posteriormente, 2,4 mL de H₂SO₄ contendo 75 mmol de tetraborato de sódio foram acrescentados aos tubos, seguindo-se nova agitação em vórtex. As amostras foram, então, submetidas a aquecimento em banho maria à aproximadamente 100 °C por 20 min, com posterior choque térmico em banho de gelo até que a solução retomasse à temperatura ambiente. Por fim, 80 µL de uma solução a 0,15% m/v de *m*-hidroxidifenil em NaOH aquoso a 0,5% m/v foram adicionados e, sequencialmente, homogeneizados por agitação. Após 10 min seguiu-se nova homogeneização e transferiu-se uma alíquota de 250 µL de cada tubo reacional para uma microplaca de 96 poços, procedendo-se à leitura da absorvância no comprimento de onda de 525 nm em leitor de microplacas. As absorvâncias determinadas foram utilizadas, após descontar-se o valor do branco, para a construção da curva analítica (FILISSETTI-COZZI & CARPITA, 1991).

Foram construídas três curvas em dias diferentes, seguindo-se o processo descrito acima. As soluções de ácido glicurônico foram preparadas nos dias dos ensaios. Procedeu-se a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados

para cada curva, obtendo-se os coeficientes de determinação (r^2) correspondentes. As curvas foram comparadas estatisticamente por análise de covariância e, após comprovada a ausência de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), uma curva média resultante foi obtida. O programa GraphPad Prism versão 5 (2007) foi utilizado para as análises estatísticas.

Anteriormente à quantificação das amostras, foram traçados espectros de varredura na região de λ de 200 a 800 nm para as soluções de leitura, com e sem a adição dos reagentes. O objetivo dessa análise é avaliar se as amostras interferem na leitura da absorvância no comprimento de onda de 525 nm. As soluções de leitura sem a adição dos reagentes não devem apresentar absorção significativa neste comprimento de onda; caso haja absorção, um branco da amostra deve ser utilizado para anular essa interferência. Durante a análise observou-se a ocorrência de *browning* (“escurecimento”) após o aquecimento para a hidrólise dos polissacarídeos. Esse fenômeno ocorre comumente em amostras em que os ácidos urônicos constituem apenas uma pequena proporção dos açúcares totais (FILISSETTI-COZZI & CARPITA, 1991). Devido ao *browning* os resultados da quantificação são superestimados. Assim, visando eliminar essa interferência, foi feito um branco de cada amostra.

As amostras foram quantificadas em soluções aquosas com concentração de 1,5 mg/mL. O mesmo solvente foi utilizado como branco. Alíquotas de 400 μ L de cada solução e do branco foram, então, transferidas para tubos de ensaio, seguindo-se a adição dos reagentes (conforme descrito para o padrão de ácido glicurônico). Os brancos das amostras foram preparados utilizando-se alíquotas de 400 μ L das soluções a serem quantificadas, seguindo-se a adição dos reagentes conforme descrito para o padrão, exceto pela adição do reagente de cor (80 μ L de NaOH aquoso a 0,5% m/v foram utilizados em substituição aos 80 μ L de solução a 0,15% m/v de *m*-hidroxidifenil em NaOH aquoso a 0,5% m/v). Alíquotas de 250 μ L foram retiradas de cada tubo reacional e adicionadas a uma microplaca de 96 poços para leitura da absorvância no λ de 525 nm em leitor de microplacas. As absorvâncias determinadas foram utilizadas, após descontar-se o valor do branco de água e dos respectivos brancos das amostras, para a determinação dos teores de ácidos urônicos.

Os teores percentuais foram calculados a partir do fator de resposta, obtido pela análise de solução padrão de ácido glicurônico contendo 18,0 µg de ácido glicurônico em 400 µL ($n = 3$), em cada dia de análise. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Microsoft Office Excel (2007), sendo os resultados expressos em termos percentuais $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

3.10.7 Determinação da massa molecular

A massa molecular aparente das amostras obtidas foi determinada por HPSEC. Utilizou-se coluna de filtração molecular Ultrahydrogel Linear (300 × 7,8 mm d.i., Waters), eluição isocrática com solução aquosa de NaNO₃ 0,1 M, fluxo de 0,5 mL/min e detecção por índice de refração. As análises foram realizadas à temperatura ambiente. Padrões de pululanas de diferentes massas moleculares (800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 e 5 kDa) foram empregados como referência, tendo sido preparadas soluções de concentração 1,0 mg/mL de cada padrão em água ultrapura. Essas soluções foram deixadas em repouso por 12 a 24 horas antes do uso para completa solubilização (conforme recomendações do fabricante). Para a análise das amostras, foram preparadas soluções de concentração 5,0 mg/mL das frações em água ultrapura. Após a completa solubilização, as amostras e os padrões foram centrifugados a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. Alíquotas de 20 µL dos sobrenadantes foram injetadas de forma manual no sistema de CLAE.

A curva de calibração foi construída a partir da injeção em triplicata de cada padrão, sendo a média dos tempos de retenção plotada em relação ao logaritmo da massa molecular (em Da). Procedeu-se a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se o coeficiente de determinação (r^2) correspondente. As massas moleculares aparentes das amostras foram determinadas a partir da curva de calibração, sendo os resultados expressos como a massa molecular aparente (em Da) $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Microsoft Office Excel (2007).

3.10.8 Avaliação da composição química dos polissacarídeos por cromatografia gasosa

3.10.8.1 Hidrólise ácida total

Os polissacarídeos foram submetidos à hidrólise ácida total visando à liberação dos monossacarídeos constituintes. Cerca de 5 mg das amostras (B1 e B2) foram diluídos em 10,0 mL de TFA 2 M e mantidos sob agitação e refluxo a 100 °C, por seis horas (SILVA *et al.*, 1993). Ao término do período, o ácido foi eliminado das amostras através de evaporação sob fluxo de ar comprimido, em temperatura ambiente, até seca.

3.10.8.2 Hidrólise ácida parcial

Os polissacarídeos foram submetidos à hidrólise ácida parcial mimetizando as condições fisiológicas gástricas. Cerca de 5 mg das amostras (B1 e B2) foram diluídos em 2,5 mL de HCl pH 2 (HCl 0,01 M) e mantidos a 37 °C em banho seco por três horas (MELLINGER *et al.*, 2008). Ao término do período, o ácido foi eliminado das amostras através de evaporação sob fluxo de ar comprimido, em temperatura ambiente, até seca.

As condições de hidrólise acima descritas foram selecionadas por proporcionarem resultados similares na hidrólise de polissacarídeos quando comparadas à hidrólise utilizando fluido gástrico com pH 1,95 (MELLINGER *et al.*, 2008).

3.10.8.3 Redução e acetilação

Os hidrolisados foram ressuspensos em 1,0 mL de água destilada, seguindo-se adição de 7,5 mg de NaBH_4 e 2 gotas de solução aquosa de NH_4OH a 1% v/v. A reação foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação, por 12 a 15 h. Após esse período, o excesso de NaBH_4 foi eliminado pela adição de gotas de ácido acético glacial e a solução foi levada à secar sob fluxo de ar comprimido, à temperatura ambiente. O ácido bórico formado foi eliminado por meio de sucessivas lavagens com metanol, sendo posteriormente eliminado por evaporação na forma de borato de trimetila (WOLFROM e THOMPSON, 1963a *apud* MELLINGER, 2006; SINGTHONG *et al.*, 2004).

Os alditóis formados após redução com NaBH_4 foram, então, acetilados com 1,0 mL de mistura de anidrido acético e piridina (1:1 v/v) por 12 h, sob agitação, à temperatura ambiente (WOLFROM e THOMPSON, 1963b *apud* MELLINGER, 2006). A acetilação foi interrompida pela adição de gelo e os acetatos de alditóis foram extraídos com diclorometano (5 mL). A piridina residual presente na solução diclorometânica foi removida por meio de sucessivas lavagens com solução aquosa de HCl 1 M. Em seguida, a fase diclorometânica foi lavada com água destilada, a fim de eliminar resíduos de HCl do meio. Os acetatos de alditóis formados foram secos e, em seguida, analisados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID).

Padrões de açúcares (glicose, galactose, xilose, manose, ramnose e arabinose) foram submetidos às reações de redução e acetilação conforme descrito para os hidrolisados.

3.10.8.4 Análise por cromatografia gasosa

Os acetatos de alditóis formados foram solubilizados em 1,0 mL de clorofórmio para análise por cromatografia gasosa, realizada no Laboratório de Cromatografia

Gasosa, DQ, ICEX, UFMG, sob supervisão da Dra. Vany Perpetua Ferraz. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chama. A coluna capilar BP10 foi empregada nas análises, sendo a injeção realizada no modo *split* (110:1). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio, com fluxo de 2,0 mL/min. Adotou-se a seguinte programação de temperatura para as análises: 200 °C por 1 minuto, seguida elevação da temperatura de 4 °C/min até 250 °C. O detector e o injetor foram aquecidos a 270 °C. As áreas e os tempos de retenção foram obtidos com o software Varian Star #1 (FERRAZ, 1991).

A relação entre a concentração de cada açúcar na amostra e as áreas de cada derivado nos cromatogramas foi avaliada a partir do cálculo da razão molar relativa (RMR) em relação à xilose (RMR=1), conforme descrito abaixo:

$$RMR_{a/xil} = (A_a/m_a/MM_a) / (A_{xil}/m_{xil}/MM_{xil}) \quad \text{Equação 1}$$

Sendo: $RMR_{a/xil}$ = razão molar relativa do açúcar em relação à xilose; A_a = área do pico do derivado do açúcar ; m_a = massa do açúcar (em gramas); MM_a = massa molar do açúcar; A_{xil} = área do pico do derivado da xilose; m_{xil} = massa da xilose (em gramas); MM_{xil} = massa molar da xilose.

A partir dos cálculos da RMR para cada açúcar, a composição monossacarídica das frações foi determinada calculando-se as porcentagens molares relativas (% mol), de acordo com a Equação 2:

$$\% \text{ mol} = [(A_a/RMR_{a/xil}).100]/(\sum A_a/RMR_{a/xil}) \quad \text{Equação 2}$$

Os cálculos foram efetuados conforme descrito por Ferraz (1991).

3.11 Avaliação da atividade antiartrítica

Utilizou-se o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) (COELHO *et al.*, 2008) para avaliar a atividade biológica da alga e suas frações enriquecidas em

polissacarídeos. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG, sob supervisão das professoras Vanessa Pinho da Silva e Danielle da Glória Souza, sendo executados pela aluna Vivian Vasconcelos Costa. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG (certificado 166/2006).

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 com idade entre 9 e 11 semanas foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB, UFMG. Os animais foram mantidos com água filtrada e ração *ad libidum*, em ambiente com controle de temperatura e umidade, em um ciclo claro-escuro de 12/12 horas durante todo o experimento.

3.11.1 Indução da artrite

Inicialmente os camundongos foram imunizados com o antígeno mBSA. Para tanto, injetou-se em cada animal, por via intradérmica, 500 µg de mBSA dissolvidos em 200 µL de uma emulsão contendo a mesma proporção de tampão fosfato salina (PBS) e adjuvante completo de Freund (CFA). Catorze dias após a imunização, os animais foram desafiados pela injeção intra-articular (articulação fêmur-tibial do joelho esquerdo de cada animal) de 10 µg de mBSA solubilizados em 10 µL de PBS. Os animais foram sacrificados 24 h após o desafio com mBSA (COELHO et al., 2008).

3.11.2 Administração dos tratamentos

Os tratamentos foram administrados por gavagem, de 12/12 horas, durante dez dias após a imunização (do 4º ao 14º dia). Suspensões das amostras foram preparadas com carboximetilcelulose a 0,05% m/v. O granulado seco da alga *L. muelleri* foi inicialmente avaliado nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, sendo a última dose selecionada para avaliação nos demais experimentos. Considerando-se que a

espécie é rica em carbonato de cálcio, um grupo de animais foi tratado com esse composto na dose de 100 mg/kg. As frações enriquecidas em polissacarídeos B1 e B2 foram avaliadas na dose de 1 mg/kg.

3.11.3 Ensaio de hipernocicepção

Para a avaliação da hipernocicepção mecânica utilizou-se um anestesiômetro eletrônico, que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força (expressa em gramas). Para o teste de pressão, uma ponteira descartável de polipropileno (4,15 mm² de diâmetro) foi adaptada ao transdutor (GUERRERO *et al.*, 2004).

Inicialmente os camundongos foram colocados em uma sala silenciosa em caixas de acrílico (12 × 10 × 17 cm), 15 a 30 minutos antes do início dos testes visando sua adaptação ao ambiente. O assoalho dessas caixas é constituído de arame não maleável de 1 mm de espessura em uma rede de malha de 5 mm². Espelhos posicionados abaixo das caixas de acrílico foram utilizados para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. Os estímulos são realizados quando os animais não estão realizando movimentos exploratórios, defecando ou repousando sobre as patas (VIVANCOS *et al.*, 2004).

O estímulo consiste na aplicação de uma força perpendicular crescente com a ponteira por entre as malhas do assoalho da caixa sobre a região central da planta da pata do animal, até que o mesmo reaja com uma resposta de tremor e retirada da pata (“*flinch*”). O anestesiômetro grava a intensidade da força aplicada no momento da retirada da pata. Os estímulos são repetidos por três vezes para garantir medidas consistentes e a correta identificação da resposta de retirada da pata, utilizando a média dos três valores para os cálculos (GUERRERO *et al.*, 2006). O teste foi realizado 14 horas antes (medida do valor basal) e 24 horas após o desafio com mBSA, sendo os resultados expressos como a diferença no limiar de retirada da pata (variação da pressão medida em gramas).

3.11.4 Migração de neutrófilos para a cavidade articular

Para avaliar a migração de neutrófilos induzida por mBSA, após o sacrifício dos animais foi realizado um lavado intra-articular com 10 µL de solução de albumina bovina a 3% em PBS, o qual foi diluído para 100 µL com a mesma solução. Este lavado foi utilizado para as contagens total e diferencial dos leucócitos.

3.11.4.1 Contagem total dos leucócitos

O número total de leucócitos foi determinado a partir de alíquotas de 30 µL do lavado articular diluídas em 60 µL de líquido de Turk. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100 vezes) e contador manual. O cálculo da porcentagem dos diferentes tipos de leucócitos (de acordo com os resultados da contagem diferencial) foi feito em relação ao número total de leucócitos determinado (COELHO *et al.*, 2008).

3.11.4.2 Contagem diferencial dos leucócitos

A partir de uma alíquota de 70 µL do lavado articular, foram preparadas lâminas para contagem diferencial por citocentrifugação, as quais foram coradas segundo a técnica de May-Grumwald e Giemsa e examinadas em microscópio óptico utilizando a objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 vezes). Foram utilizados os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^4$ / cavidade articular (COELHO, 2007).

3.11.5 Análises histopatológicas

A articulação fêmur-tibial foi removida cirurgicamente e dissecada mantendo-se o invólucro muscular, sendo fixada em solução de formalina a 10% v/v (formaldeído 37% v/v e Na₂HPO₄ 0,65% m/v, pH 7,2) em 24 horas. As amostras foram, então, lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% (pH 7,2), em temperatura ambiente, por um período de três semanas. Seguiu-se nova lavagem das peças em água corrente e desidratação em banhos de álcool (70%, 80%, 90% e álcool absoluto). A seguir, as peças foram diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo obtendo-se cortes consecutivos de 5 µm, que foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE) ou azul de toluidina (TB). Secções verticais da articulação fêmur-tibial foram analisadas em um microscópio óptico adaptado a uma câmera digital (COELHO, 2007).

Para a obtenção do índice de artrite, duas secções de cada articulação foram avaliadas microscopicamente, de forma aleatória e cega, por um patologista, considerando-se os seguintes parâmetros: severidade da hiperplasia sinovial, intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e erosão óssea. Para cada parâmetro foi atribuída uma nota que variou de 0 (normal) a 3 (grave), exceto para a erosão óssea cuja nota variou de 0 (normal) a 2 (grave). As notas foram então somadas a fim de se obter o índice de artrite (variando de 0-8) (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2007).

As lâminas coradas pelo azul de toluidina permitiram estimar o conteúdo de proteoglicanos na cartilagem, sendo os resultados expressos como a porcentagem da área corada em relação à superfície total avaliada (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2011).

3.11.6 Determinação de quimiocinas no tecido periarticular

A determinação de quimiocinas (quimiocinas CXC ligantes CXCL1 e CXCL2) foi feita por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) no tecido periarticular do joelho. Cada 100 mg de tecido foram homogeneizados com 1 mL da solução para extração de quimiocinas (solução contendo PBS, antiproteases e Tween 20), seguindo-se centrifugação por 10 minutos a 4 °C e 10.000 *g*. O sobrenadante foi retirado para o ensaio de ELISA, sendo diluído na proporção de 1:3 em PBS. Os *kits* de ELISA para determinação de CXCL1 e CXCL2 foram utilizados de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante, sendo a absorvância medida em $\lambda=492$ nm em leitor de ELISA (COELHO *et al.*, 2008).

3.11.7 Avaliação da atividade de mieloperoxidase

A atividade de mieloperoxidase (MPO) foi quantificada para avaliar o acúmulo de neutrófilos no tecido periarticular do joelho. O resíduo resultante da centrifugação descrita no item 3.11.6 foi ressuspensionado em tampão fosfato pH 4,7 (NaCl 0,1 M; Na₃PO₄ 0,02 M; Na₂EDTA 0,015 M), homogeneizado e centrifugado (10.000 *g*, 10 min). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1,5 mL de NaCl 0,2% gelado e 1,5 mL de NaCl 1,6% com glicose 5% gelada para cada 100 mg de tecido. Realizou-se nova centrifugação a 10.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuspensionado em tampão fosfato com brometo de hexadeciltrimetilamônio (HETAB) pH 5,4 (Na₃PO₄ 0,05 M; HETAB 0,5% m/v), sendo novamente homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas seguidamente (três vezes) em nitrogênio líquido, submetidas novamente a centrifugação (10.000 *g*, 15 min) e o sobrenadante coletado para o ensaio de MPO. As amostras do tecido periarticular foram diluídas três vezes antes do ensaio, sendo utilizadas alíquotas de 25 μ L para o ensaio.

A atividade de MPO foi determinada a partir de um método colorimétrico utilizando tetrametilbenzina (TMB 1,6 mM em DMSO; 25 μ L/poço) e peróxido de hidrogênio

(0,002% v/v; 100 µL/poço), sendo a reação interrompida pela adição de H₂SO₄ 1 M, seguindo-se a leitura de absorvância em $\lambda=450$ nm em um leitor de ELISA. Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos (unidades relativas - UR) por comparação da densidade óptica do sobrenadante do tecido avaliado com neutrófilos do pulmão de camundongos processados da mesma maneira (BARCELOS *et al.*, 2005; COELHO, 2007).

3.11.8 Avaliação do recrutamento de leucócitos na microvasculatura do joelho

Utilizou-se a técnica de microscopia intravital para avaliar o recrutamento de leucócitos na microcirculação sinovial do joelho dos camundongos (VEIHELMANN *et al.*, 1998). Os animais foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de uma mistura de xilazina (100 mg/kg), cetamina (200 mg/kg) e PBS. A administração de reagentes experimentais, rodamina 6G e volume adicional de anestésico, foi feita a partir da canulação da veia caudal. A visualização dos vasos sanguíneos na região do joelho foi possível após a ressecção do tendão patelar da pata traseira esquerda de cada animal. Uma injeção intravenosa de rodamina 6G (0,3 mg/kg) foi administrada logo após o procedimento cirúrgico para permitir a marcação dos leucócitos (COELHO, 2007).

Os eventos celulares foram acompanhados com o uso de um microscópio com objetiva de 20 vezes acoplado a uma câmera de vídeo (para gravação das imagens e posteriores contagens de leucócitos). Para a determinação dos leucócitos aderentes considerou-se aqueles que permaneciam estacionados no endotélio vascular por pelo menos 30 segundos, sendo a adesão leucocitária total expressa como o número total de células aderentes em 100 µm de comprimento da vênula em análise (células/mm²). Os leucócitos rolando foram definidos como as células que se moviam mais lentamente que aquelas com um fluxo regular no vaso (eritrócitos). Os resultados para o rolamento foram expressos como células/min, sendo determinados a partir da contagem do número de células passando por um determinado ponto na vênula por minuto. Três a quatro vasos sanguíneos foram avaliados para cada animal (COELHO *et al.*, 2008; VEIHELMANN *et al.*, 1998).

3.11.9 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para cada grupo de animais (sete por grupo). Os dados foram avaliados por meio de análise de variância simples (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), que realiza a comparação de todos os grupos entre si. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição mineral do granulado de *L. muelleri*

A composição do granulado de *Lithothamnion muelleri* em termos percentuais para os elementos Al, Ca, Cu, Fe, Mg e Zn está descrita na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1 – Composição mineral do granulado de *L. muelleri*.

Elemento	% média $\pm$ desvio padrão (n=3)
Al	0,26 $\pm$ 0,01
Ca	34,76 $\pm$ 0,42
Cu	< 0,0003
Fe	0,1995 $\pm$ 0,003
Mg	2,71 $\pm$ 0,07
Zn	< 0,0008

Os dados obtidos são consistentes com a composição química de uma alga vermelha calcária, com porcentagem majoritária de cálcio, uma vez que essas algas precipitam carbonato de cálcio entre suas paredes celulares na forma de cristais de calcita (AMANCIO, 2007). Estima-se que o conteúdo total de CaCO_3 para as espécies de coralináceas calcárias varie de 80 a 90% de toda a sua biomassa (BILAN & USOV, 2001). Destaca-se, também, a presença de magnésio, outro elemento precipitado na forma de carbonato em algas vermelhas. As porcentagens encontradas para cálcio e magnésio no granulado de *L. muelleri* estão de acordo com aquelas relatadas por Blunden *et al.* (1997) para a composição de bancos de rodólitos. Ferro e alumínio também estão presentes no granulado de *L. muelleri*, enquanto apenas traços de cobre e zinco foram detectados.

A análise da composição mineral do granulado é relevante, uma vez que esses elementos podem interferir em processos fisiológicos. Além disso, é possível que alguns minerais estejam associados às estruturas dos polissacarídeos e proteínas constituintes, influenciando suas atividades biológicas.

4.2 Avaliação das condições extrativas e de obtenção das frações enriquecidas em polissacarídeos

Para a obtenção de frações enriquecidas em polissacarídeos a partir de *L. muelleri*, optou-se, inicialmente, pelo processo de extração aquosa seguida de extrações alcalinas, conforme descrito por Soares (2009). A obtenção de polissacarídeos constituintes de paredes celulares é mais difícil que polissacarídeos de reserva, o que requer adaptações aos processos de extração comumente utilizados. De maneira geral, utiliza-se água em diferentes temperaturas para a extração de polissacarídeos neutros (CUI 2005). No caso de *L. muelleri*, observou-se um rendimento muito baixo para a fração enriquecida em polissacarídeos AQ, advinda da extração aquosa a 60 °C por 6 h (rendimento médio $\pm$ desvio padrão: 0,0157% $\pm$ 0,0005). Esse fato pode estar relacionado à presença de ácidos urônicos na cadeia dos polissacarídeos (açúcares ácidos); nesse caso, extrações utilizando soluções levemente básicas tendem a ser mais eficientes (CUI, 2005).

Assim, optou-se por avaliar se a eliminação da etapa inicial de extração aquosa alteraria de forma significativa o rendimento global do processo. Dessa forma, os dois processos extrativos foram comparados em relação ao rendimento global (**Tabela 4.2**). O processo de extrações alcalinas subsequentes (extração 2) proporcionou um maior rendimento global que a extração aquosa seguida de extrações alcalinas (extração 1), sendo a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, teste *t* de Student para amostras não pareadas). Assim, considerando os resultados obtidos e visando a simplificação do processo, adotou-se a extração 2 como padrão no presente trabalho.

Tabela 4.2 – Rendimentos, expressos como somatório das frações enriquecidas em polissacarídeos, nos processos extrativos avaliados.

Processo	Rendimento total (% $\pm$ DP, $n=3$)
Extração 1 (AQ+B1+B2)	0,1034 $\pm$ 0,0038 ^a
Extração 2 (B1+B2)	0,1160 $\pm$ 0,0022 ^b

* Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo o teste *t* de Student ($p < 0,05$).

Em seguida, realizou-se a adequação das condições extrativas avaliando-se diferentes períodos de extração. Em todos os experimentos a temperatura adotada foi de 60 °C, definida nos experimentos extrativos anteriormente realizados por Soares (2009). Foram avaliados os períodos de 1, 2, 4 e 6 h de extração (**Tabela 4.3**). Não houve diferença estatisticamente significativa para o rendimento total das extrações por 1, 2 e 6 h. A extração por 4 h apresentou um rendimento ligeiramente maior ($p < 0,05$, teste t de Student para amostras não pareadas). Porém, considerando-se que essa diferença em termos de rendimento leva a uma pequena diferença em termos da massa total obtida e requer o dobro do tempo, optou-se por padronizar o tempo de extração em 2 h. O tempo de 1 h não foi adotado como padrão uma vez que variações ocasionais da temperatura de extração afetariam o processo de forma mais expressiva que a extração por 2 h.

Tabela 4.3 – Rendimentos, expressos como somatório das frações B1 e B2, em diferentes tempos de extração.

Tempo de extração	Rendimento total (% $\pm$ DP, $n=3$)
1 h	0,1197 $\pm$ 0,0045 ^a
2 h	0,1160 $\pm$ 0,0022 ^a
4 h	0,1296 $\pm$ 0,0070 ^b
6 h	0,1070 $\pm$ 0,0071 ^a

* Letras minúsculas distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo o teste t de Student ($p < 0,05$).

Posteriormente, avaliou-se o efeito de diferentes solventes na precipitação dos polissacarídeos. Comumente utiliza-se etanol nessa etapa de purificação das frações enriquecidas em polissacarídeos. Porém, em soluções muito diluídas ou em caso de polissacarídeos com baixa massa molecular, a precipitação com etanol pode não ser eficiente (CUI, 2005). Assim, avaliou-se acetona para a precipitação dos polissacarídeos, sendo os resultados, em termos de rendimento total das frações, comparados com o uso de etanol (**Tabela 4.4**). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os rendimentos obtidos com os dois solventes, sendo o etanol selecionado para as demais extrações devido ao menor tempo necessário para a formação do precipitado.

Tabela 4.4 – Rendimentos, expressos como somatório das frações B1 e B2, nos solventes empregados para a precipitação de polissacarídeos.

Solvente utilizado na precipitação	Rendimento total (% $\pm$ DP, $n=3$)
Etanol	0,1160 $\pm$ 0,0022 ^a
Acetona	0,1289 $\pm$ 0,0123 ^a

* Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as médias, segundo o teste *t* de Student ($p > 0,05$).

L. muelleri é uma alga calcária de ocorrência em baixas e altas profundidades (AMADO-FILHO *et al.*, 2010; HENRIQUES *et al.*, 2011). A precipitação de carbonato de cálcio em suas paredes celulares é um mecanismo intrínseco de proteção desse organismo (BILAN & USOV, 2001). Considerando que os polissacarídeos são metabólitos primários que atuam como componentes estruturais e na proteção mecânica de algas, sua produção deverá ser menor em organismos que contam com outros mecanismos de proteção. Assim, uma relação inversa é observada entre a produção de polissacarídeos e o grau de mineralização do talo algal (BILAN & USOV, 2001). Além disso, a grande quantidade de minerais associados a partir da água do mar faz com que compostos normalmente comuns em algas (como agar, alginatos e carragenanas) estejam praticamente ausentes em espécies calcárias (ASLAM, PARUCHURI *et al.*, 2010). Todos esses fatores estão diretamente relacionados com os baixos rendimentos observados na obtenção de frações enriquecidas em polissacarídeos a partir da espécie *L. muelleri*.

4.3 Análise da composição química qualitativa das frações enriquecidas em polissacarídeos

A composição monossacarídica das frações B1 e B2 foi avaliada de forma qualitativa empregando CCD de celulose, após hidrólise ácida das amostras. As manchas nos cromatogramas obtidos para os hidrolisados de B1 e B2 (**Figura 4.1**) indicam a presença de galactose e xilose, podendo-se observar também grande similaridade das amostras. Devido à semelhança estrutural entre os monossacarídeos glicose, galactose e manose, seus fatores de retenção (*R_f*) são muito próximos, o que não

permite afirmar a ausência de qualquer um desses açúcares. Também não se pode descartar a presença de açúcares minoritários na composição dos polissacarídeos, não detectados devido às baixas concentrações.

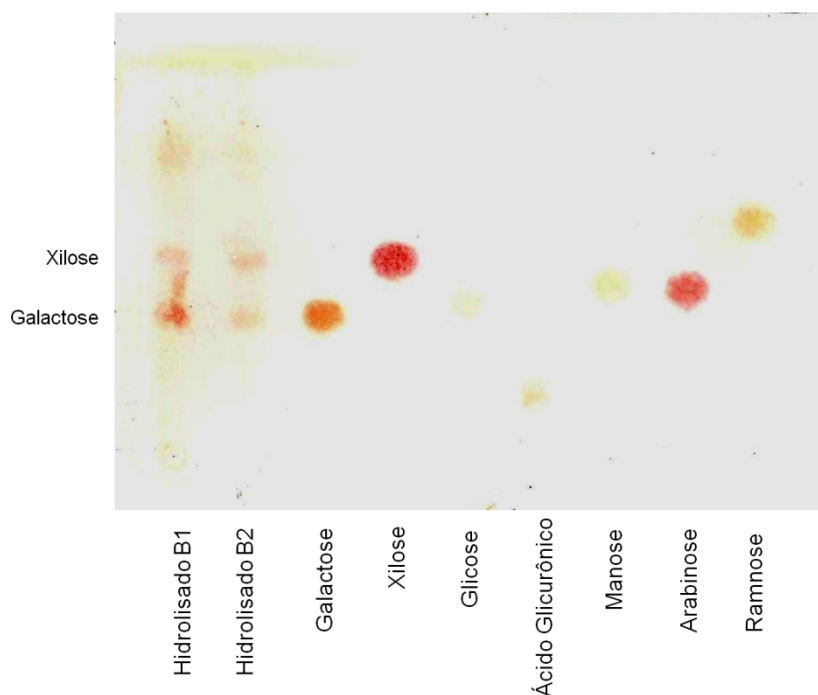


Figura 4.1 – Perfil cromatográfico do hidrolisado das frações B1 e B2, obtido por CCD de celulose. Eluente: *n*-BuOH:EtOAc:Py:H₂O (6:1:5:4). Revelador: anilina:ácido ftálico.

Tendo em vista a grande similaridade entre as amostras B1 e B2, repetiu-se o procedimento empregando-se uma mistura de B1 e B2. As manchas obtidas nesse cromatograma novamente indicaram a presença de galactose e xilose, sendo possível, também, visualizar uma pequena mancha referente ao ácido glicurônico (Figura 4.2).

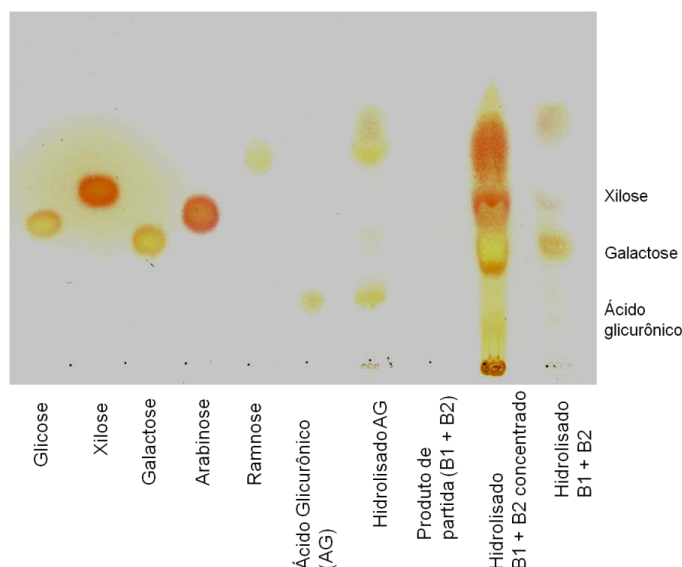


Figura 4.2 – Perfil cromatográfico de mistura de hidrolisados das frações B1 e B2, obtida por CCD de celulose. Eluente: *n*-BuOH:EtOAc:Py:H₂O (6:1:5:4). Revelador: anilina:ácido ftálico.

4.4 Fracionamentos cromatográficos

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados por filtração molecular utilizando Sephadex G-100 como fase estacionária. Este suporte cromatográfico constitui-se de um gel poroso de dextranas, com tamanho de partículas controlado. A separação ocorre de acordo com as diferenças de tamanho molecular e arranjo tridimensional (volume molecular), sendo o Sephadex G-100 capaz de separar moléculas de 1 a 100 kDa. Quanto maior o volume da molécula, menor o tempo de retenção na coluna, uma vez que moléculas maiores entram menos nos poros do suporte cromatográfico.

4.4.1 Fracionamento de B1

O perfil cromatográfico de B1 em coluna aberta de Sephadex G-100 está representado na **Figura 4.3**.

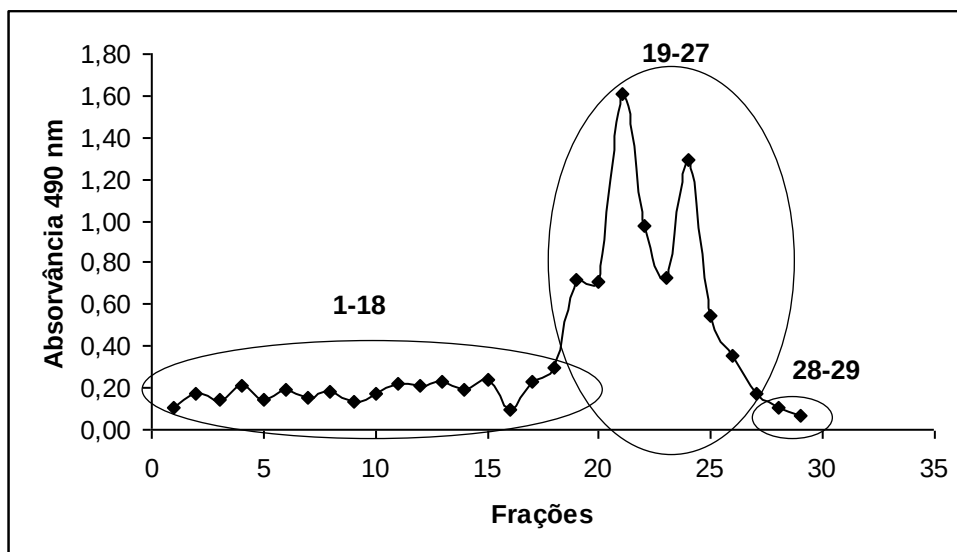


Figura 4.3 – Perfil cromatográfico do fracionamento 1 de B1 em coluna aberta de Sephadex G-100 (45 × 3 cm d.i.) e eluição com água destilada. Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.

As frações foram reunidas de acordo com a intensidade da absorvância no comprimento de onda de 490 nm. Assim, têm-se inicialmente as frações 1-18, correspondentes aos polissacarídeos de maior massa molecular (25,1 mg). Em seguida, as frações 19-27, correspondentes à banda principal (maior absorvância), com polissacarídeos de menor massa molecular (88,2 mg). As frações 28-29 indicam o término da eluição cromatográfica (0,4 mg). A perda de material associada ao fracionamento foi de 24,2%.

Buscando melhorar a separação cromatográfica e reduzir o tempo de eluição (aproximadamente 16 horas), optou-se por realizar um novo fracionamento utilizando o mesmo suporte cromatográfico (coluna de Sephadex G-100, 30 × 2,5 cm d.i.), porém com controle do fluxo de eluição através de bomba peristáltica. O tempo de eluição foi significativamente reduzido (aproximadamente 6 h) e o perfil cromatográfico está representado na **Figura 4.4**.

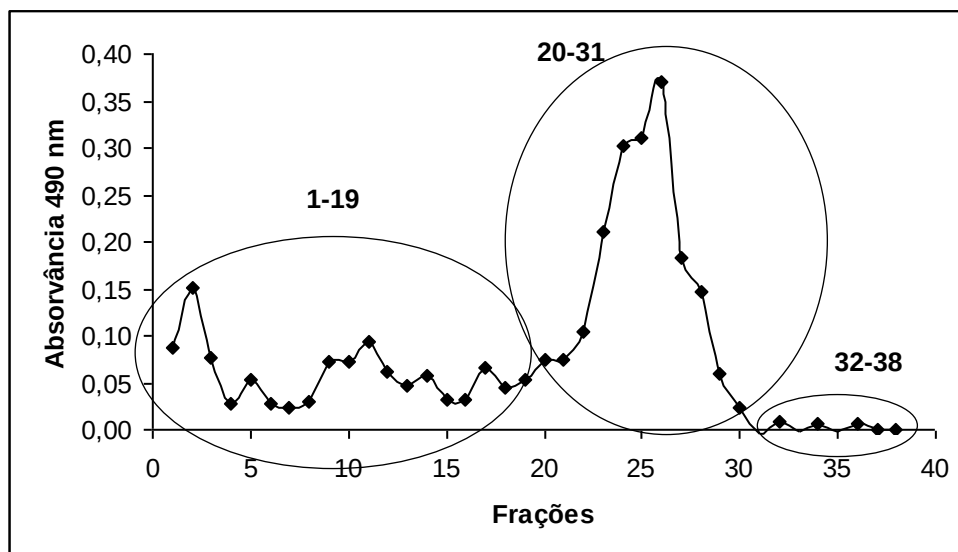


Figura 4.4 – Perfil cromatográfico do fracionamento 2 de B1 em coluna de Sephadex G-100 (30 × 2,5 cm d.i.) e eluição com água destilada sob fluxo controlado (0,5 mL/min). Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.

O perfil de duas bandas principais, correspondentes a polissacarídeos de diferentes tamanhos moleculares, manteve-se. Após reunião das frações 1-19 (14,3 mg), 20-31 (60,4 mg) e 32-38 (0,2 mg), computou-se uma perda de 25,1% associada ao fracionamento.

No caso da cromatografia de filtração molecular, a separação cromatográfica é melhor quanto maior o comprimento da coluna (maior o caminho a ser percorrido pelas moléculas). Desse modo, optou-se por aumentar o comprimento da coluna de Sephadex G-100 para 70 cm. O fluxo do eluente foi aumentado para 0,8 mL/min para evitar um tempo de análise muito longo. Assim, foi feito um novo fracionamento cujo tempo de eluição foi de aproximadamente 8 h e seu perfil está representado na **Figura 4.5**.

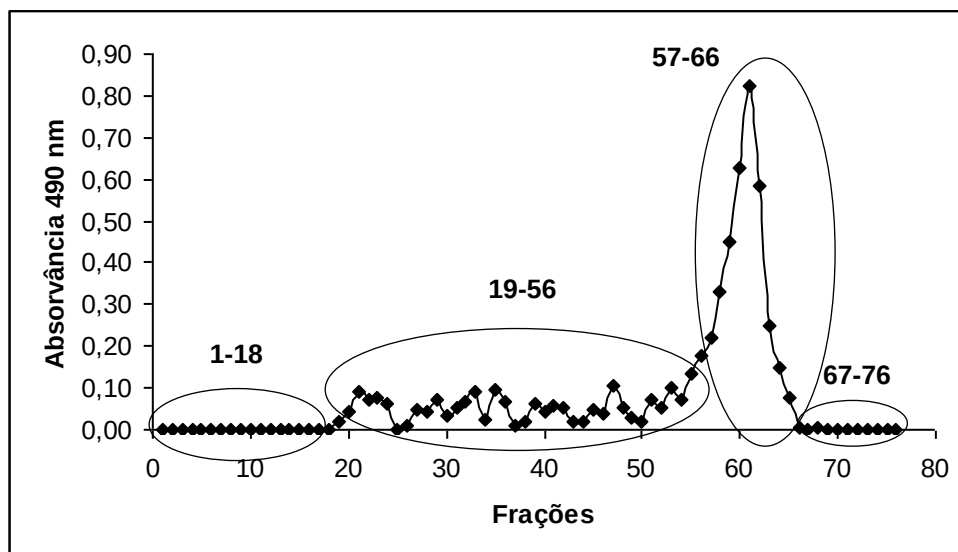


Figura 4.5 – Perfil cromatográfico do fracionamento 3 de B1 em coluna de Sephadex G-100 (70 × 2,5 cm d.i.) e eluição com água destilada sob fluxo controlado (0,8 mL/min). Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.

As frações 1-18 correspondem ao volume morto. Os polissacarídeos de maior massa molecular foram recolhidos nas frações 19-56 (38,4 mg) e os de menor massa molecular nas frações 57-66 (79,6 mg). As frações 67-76 (1,0 mg) indicam o fim da eluição. Novamente houve manutenção do perfil de duas bandas principais, porém com melhor resolução para o pico principal (frações 57-66). A perda de material associada ao fracionamento foi de 20,7%. Considerando-se os melhores resultados obtidos neste último fracionamento, foram adotadas as mesmas condições descritas acima para os demais.

As frações 19-27 (fracionamento 1) e 20-31 (fracionamento 2), correspondentes ao pico principal, foram reunidas e recromatografadas utilizando as condições padronizadas no terceiro fracionamento (coluna de Sephadex G-100, 70 × 2,5 cm, eluição com água destilada a 0,8 mL/min). O perfil cromatográfico está representado na **Figura 4.6**.

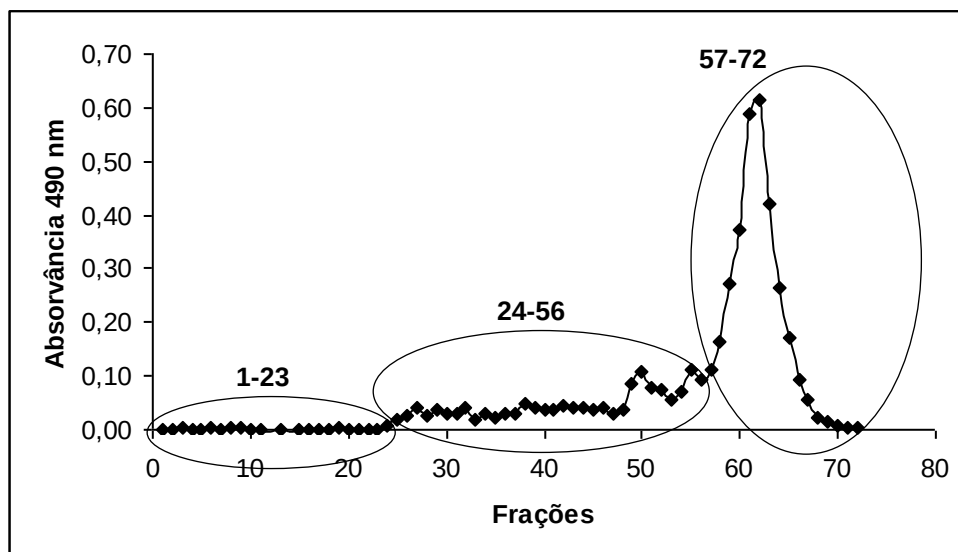


Figura 4.6 – Perfil cromatográfico do fracionamento 4 de B1 em coluna de Sephadex G-100 (70 × 2,5 cm d.i.) e eluição com água destilada sob fluxo controlado (0,8 mL/min). Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.

As frações 1-23 correspondem ao volume morto. Os polissacarídeos de maior massa molecular foram recolhidos nas frações 24-56 (20,1 mg) e os de menor massa molecular nas frações 57-72 (115,8 mg). A perda de material associada ao fracionamento foi de 8,6%, sendo menor que nos fracionamentos anteriores por tratar-se de um material que já havia sido cromatografado e, portanto, não foi submetido à centrifugação.

O resíduo resultante dos picos principais dos fracionamentos 3 (frações 57-66) e 4 (57-72) foi reunido e denominado Fra B1. Essa amostra foi utilizada para a caracterização estrutural dos polissacarídeos (itens 3.10.2 a 3.10.8).

4.4.2 Fracionamento de B2

O fracionamento de B2 foi efetuado (item 3.8.4) de acordo com as condições cromatográficas estabelecidas para o fracionamento de B1. O perfil cromatográfico obtido está representado na **Figura 4.7**.

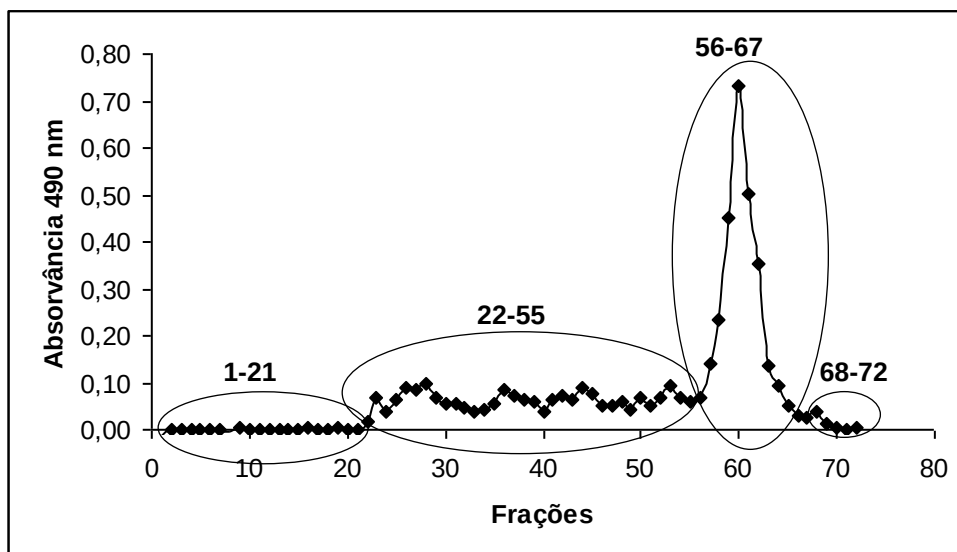


Figura 4.7 – Perfil cromatográfico do fracionamento de B2 em coluna de Sephadex G-100 (70 × 2,5 cm d.i.) e eluição com água destilada sob fluxo controlado (0,8 mL/min). Detecção em $\lambda=490$ nm após reação com fenol-ácido sulfúrico.

As frações 1-21 correspondem ao volume morto. Os polissacarídeos de maior massa molecular foram recolhidos nas frações 22-55 (30,5 mg) e os de menor massa molecular nas frações 56-67 (84,3 mg). As frações 68-72 (4,0 mg) indicam o fim da eluição. O perfil cromatográfico de B2 foi idêntico ao de B1, com uma banda larga relativa aos polissacarídeos de maior massa molecular e um pico intenso correspondente aos polissacarídeos de menor massa molecular. A perda de material associada ao fracionamento foi de 20,8%. O pico principal (frações 56-67) foi denominado Fra B2, sendo empregado nas análises de caracterização estrutural dos polissacarídeos (itens 3.10.2 a 3.10.8).

4.5 Análises por cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho

As frações enriquecidas em polissacarídeos B1 e B2 e as amostras resultantes dos fracionamentos Fra B1 e Fra B2 foram analisadas por HPSEC. Os perfis cromatográficos obtidos estão representados na **Figura 4.8**.

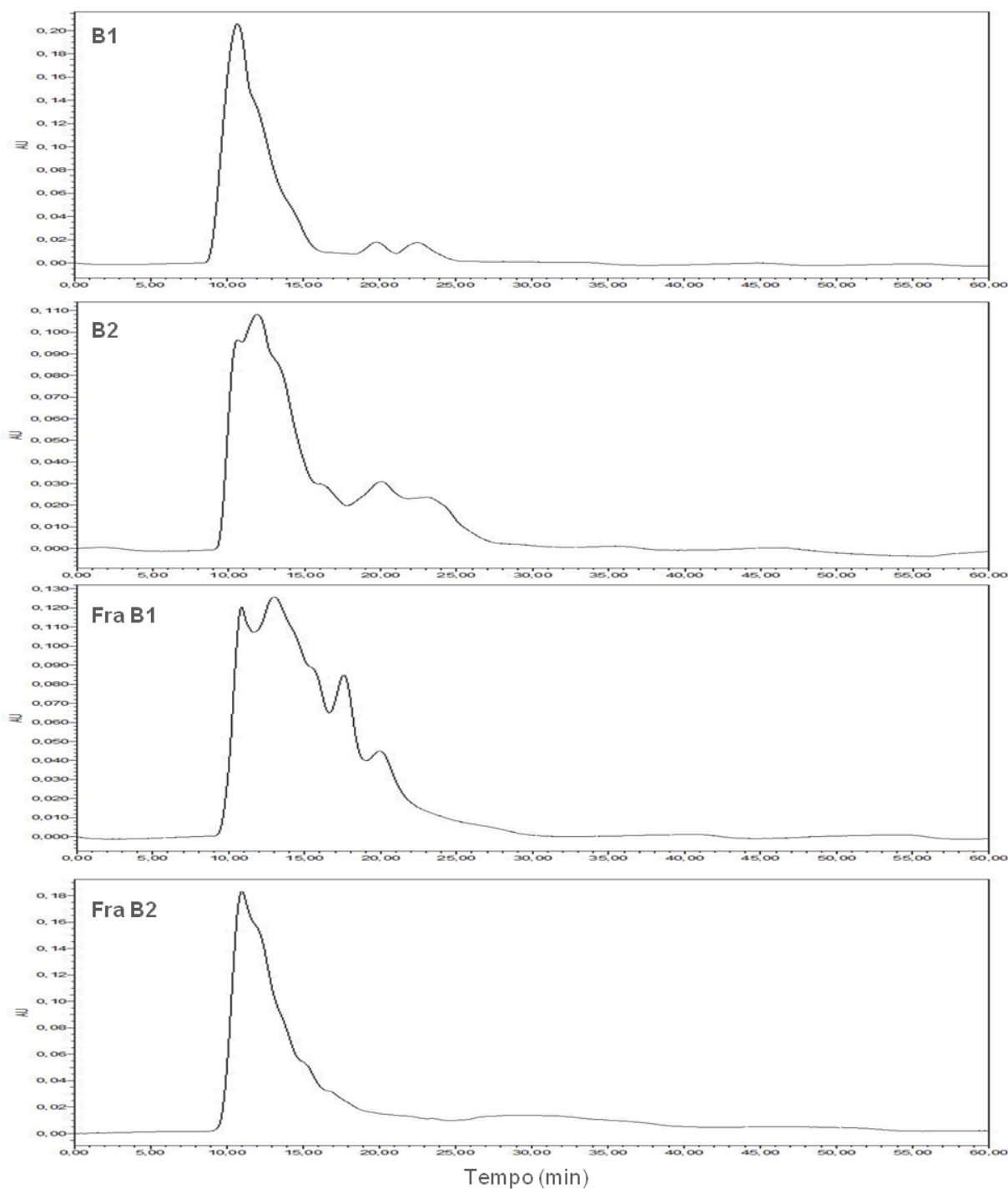


Figura 4.8 – Cromatogramas obtidos por HPSEC para as frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 3.9.

Os cromatogramas de B1 e B2 apresentaram reduzida complexidade, sendo bastante semelhantes. Para B1 nota-se um pico majoritário, largo, com tempo de retenção (TR) de aproximadamente 11 minutos, além de dois picos menores com TR aproximados de 20 e 23 minutos. O cromatograma de B2 também apresenta um pico largo majoritário (TR de aproximadamente 12 minutos) e dois picos de menor

intensidade (TR aproximados de 20 e 23 minutos). Em ambos os casos observa-se que o pico principal possui TR entre 10 e 16 minutos, sendo bastante largo. Este perfil pode indicar uma mistura de polissacarídeos com pequenas diferenças de massas moleculares. Possivelmente tem-se um único polissacarídeo que, devido aos processos utilizados para extração (meio básico extrator, aquecimento e etapas de secagem) sofreu uma pequena fragmentação. O mesmo pode ser inferido para Fra B1 e Fra B2. No caso de Fra B1 a fragmentação parece ter ocorrido de forma mais significativa, uma vez que vários picos sobrepostos são vistos entre 10 e 20 minutos.

4.6 Caracterização estrutural dos polissacarídeos

4.6.1 Espectroscopia no infravermelho

As análises espectroscópicas no infravermelho indicam a presença de polissacarídeos sulfatados nas frações B1 e B2 (**Figura 4.9**). A sobreposição dos espectros de B1 e B2 (**Figura 4.10**) sugere uma composição química similar para as duas frações.

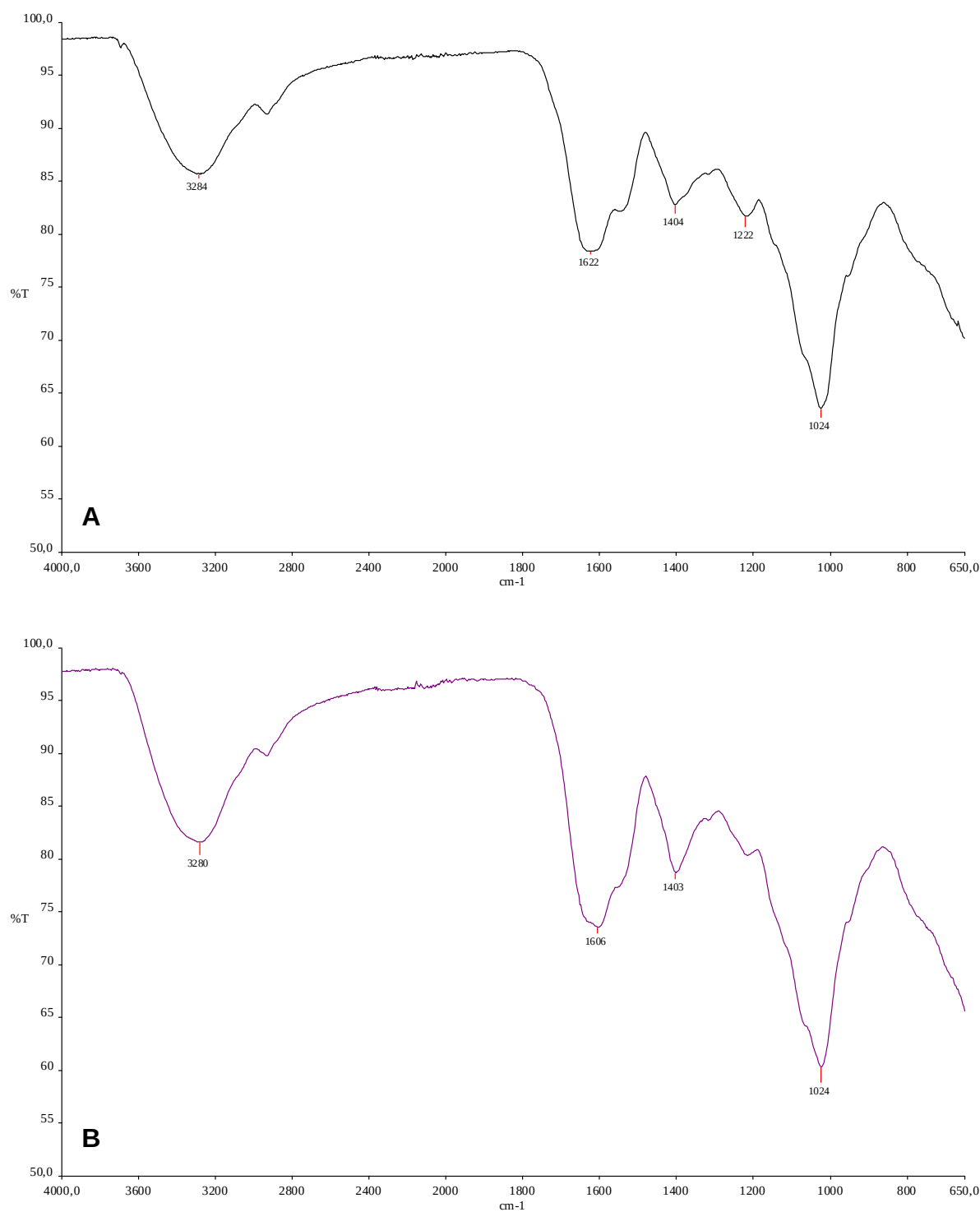


Figura 4.9 – Espectros no infravermelho obtidos para as frações enriquecidas em polissacarídeos B1 (A) e B2 (B).

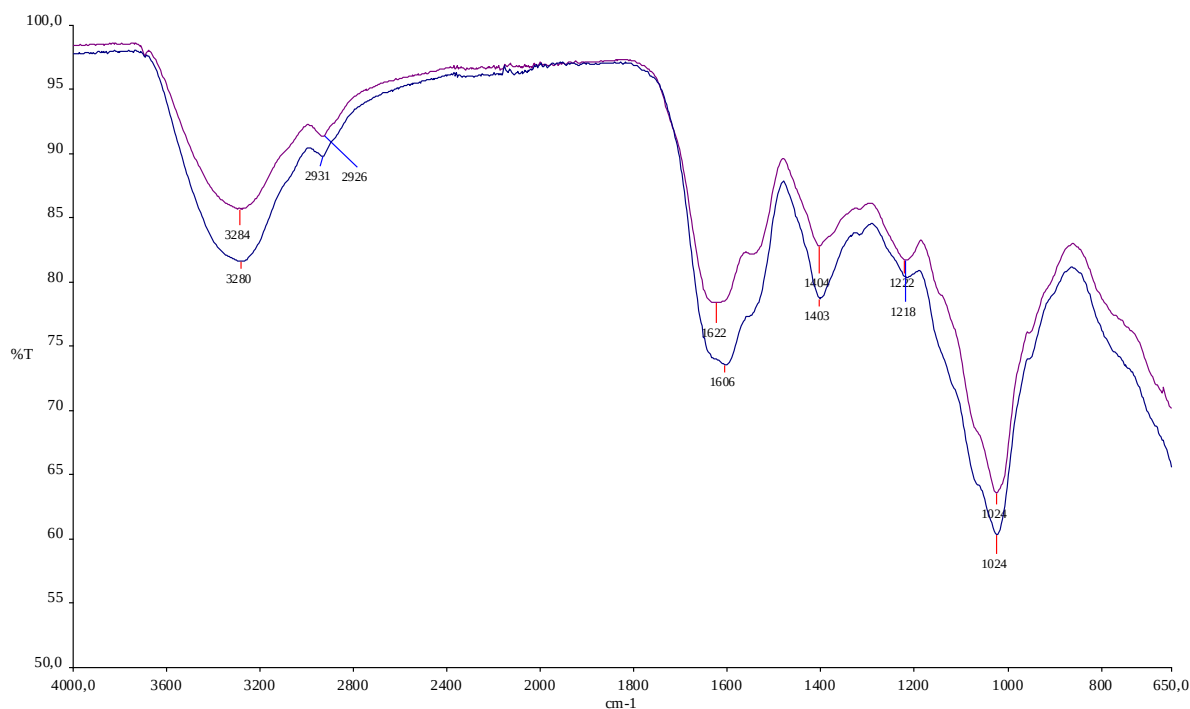


Figura 4.10 – Sobreposição dos espectros no infravermelho obtidos para as frações B1 (rosa) e B2 (azul).

A banda larga e intensa próxima a 3280 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de grupos O-H de alcoóis em interação polimérica. A presença de hidroxilas foi confirmada pela banda de estiramento C-O de alcoóis em 1.024 cm^{-1} . Uma banda larga em torno de 3280 cm^{-1} ocorre também pelo estiramento de ligação O-H de ácidos carboxílicos, grupo funcional presente em ácidos urônicos. A presença das bandas em $1622/1606\text{ cm}^{-1}$ e $1403/1404\text{ cm}^{-1}$, correspondentes, respectivamente, aos estiramentos assimétrico e simétrico de carbonilas de ânions carboxilato, reforça a ocorrência de açúcares ácidos. A presença de grupos sulfato pode ser inferida pelos sinais em torno de 1400 cm^{-1} (estiramento assimétrico) e 1200 cm^{-1} (estiramento simétrico), característicos do grupo SO_2 . Por fim, a banda de média intensidade em torno de 2930 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de ligações C-H (MAO *et al.*, 2006; MAO *et al.*, 2004; SOARES, 2009).

4.6.2 Espectroscopia no ultravioleta/visível

Adotou-se o método colorimétrico descrito por Dubois *et al.* (1956), com adaptações para microplaca (MASUKO *et al.*, 2005), para a avaliação qualitativa dos açúcares presentes nas amostras. As grandes vantagens desse método são a possibilidade de quantificar os açúcares totais sem a necessidade de hidrólise prévia, a simplicidade e a capacidade de detecção de diversos tipos de açúcares.

O método baseia-se na desidratação de açúcares que possuam um grupo redutor livre ou potencialmente livre a derivados hidroximetilfurfural (hexoses) ou furfural (pentoses e ácidos urônicos) na presença de H_2SO_4 concentrado e aquecimento. Em seguida, há a condensação desses derivados com o fenol, formando complexos coloridos (RAO & PATTABIRAMAN, 1989; DISCHE, 1955) (**Figura 4.11**). Pentoses e ácidos urônicos apresentam um máximo de absorção em torno de $\lambda=480$ nm, enquanto hexoses e seus derivados metilados apresentam máximos de absorção na faixa de comprimentos de onda de 485 a 490 nm (DUBOIS *et al.*, 1956).

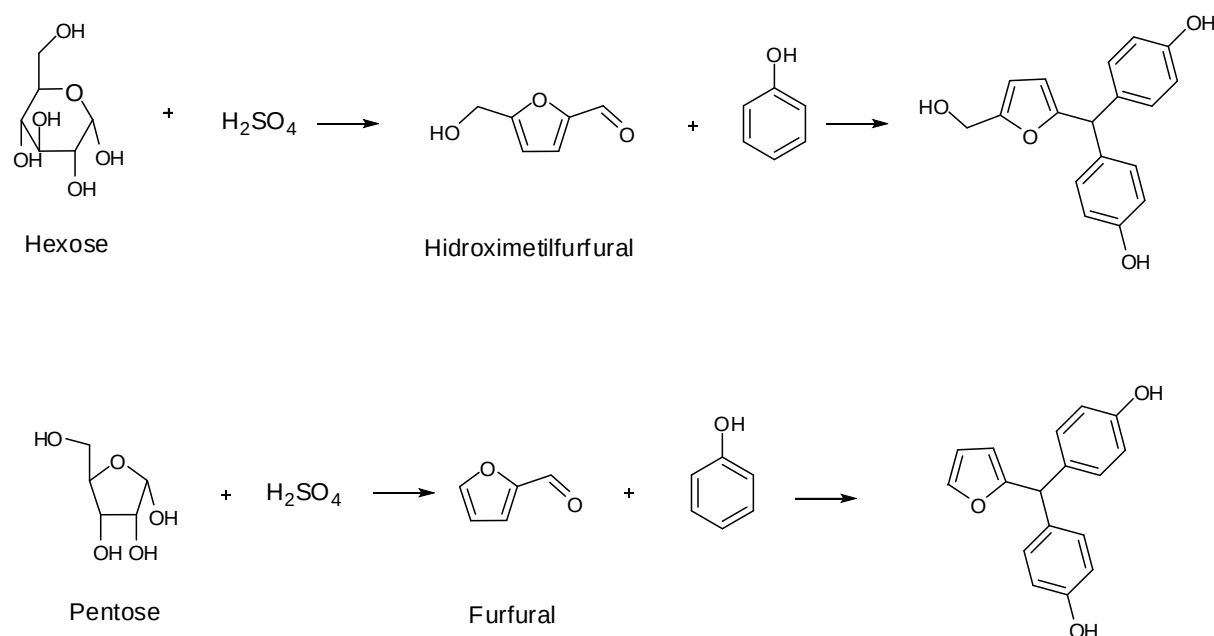


Figura 4.11 – Fundamento químico da reação colorimétrica com fenol- H_2SO_4 para quantificação de açúcares totais em polissacarídeos.

Os espectros traçados para B1, B2, Fra B1 e Fra B2 após a reação colorimétrica estão representados na **Figura 4.12**. Observaram-se máximos de absorção em torno de $\lambda=482$ nm. Este comprimento de onda é próximo aos máximos comumente encontrados para pentoses e ácidos urônicos ($\lambda=480$ nm) e hexoses ($\lambda=485-490$ nm), indicando a provável presença desses diferentes tipos de açúcares como constituintes dos polissacarídeos de *L. muelleri*.

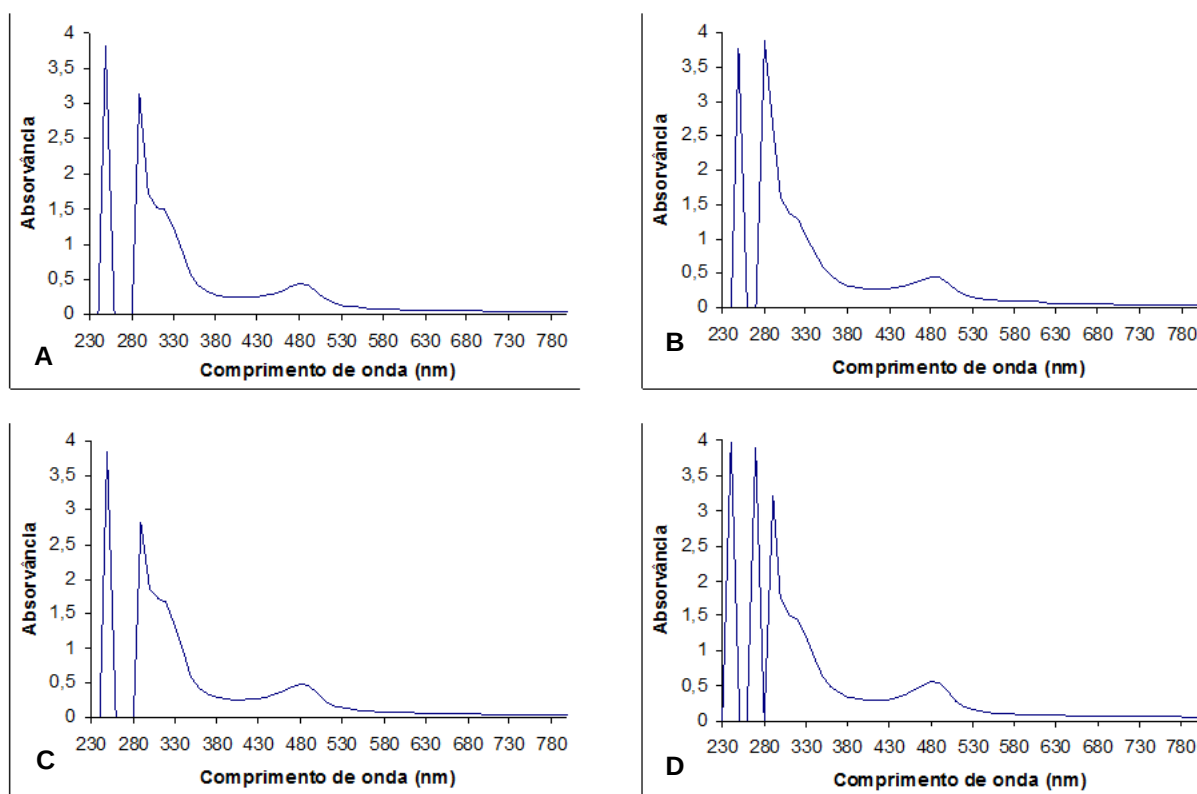


Figura 4.12 – Espectros de varredura no UV/VIS para as frações B1 (A), B2 (B), Fra B1 (C) e Fra B2 (D) após reação colorimétrica com fenol- H_2SO_4 para quantificação de açúcares totais.

4.6.3 Quantificação de açúcares totais

A quantidade de açúcares totais presente nas frações enriquecidas em polissacarídeos foi avaliada pelo método colorimétrico descrito por Dubois *et al.* (1956), com adaptações para microplaca (MASUKO *et al.*, 2005). A leitura de absorvância no comprimento de onda de 490 nm permite detectar a maioria dos açúcares em seu máximo de absorção ou próximo a ele (MASUKO *et al.*, 2005).

Para avaliar a seletividade do método em relação a possíveis interferentes contidos nas matrizes, foram traçados espectros de varredura no UV/VIS nos comprimentos de onda de 230 a 800 nm para soluções de leitura de B1, B2, Fra B1 e Fra B2, com e sem a adição dos reagentes do método colorimétrico. Os espectros obtidos indicam ausência de interferência das matrizes no comprimento de onda de leitura ($\lambda=490$ nm). Portanto, nas quantificações realizadas não foi necessário o uso de um branco para cada amostra. Os espectros registrados para B1, B2, Fra B1 e Fra B2 foram idênticos. A título de ilustração, mostra-se o espectro obtido para B1 (**Figura 4.13**).

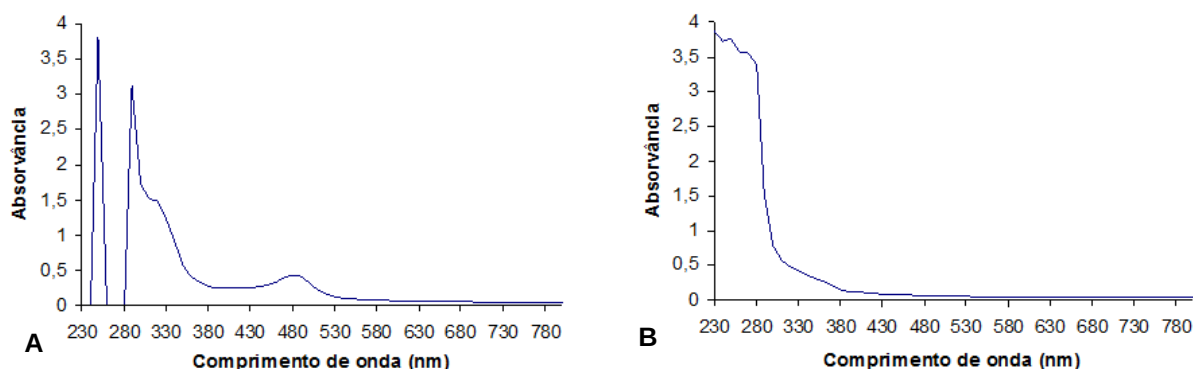


Figura 4.13 – Espectros de varredura no UV/VIS para a solução de leitura de B1 com (A) e sem (B) a adição dos reagentes colorimétricos para quantificação de açúcares totais.

Procedeu-se a construção de uma curva analítica considerando a relação entre a absorvância e a concentração de açúcares totais. Foram empregadas soluções de galactose com concentrações variando de 1,5 a 0,3 mg/mL. As soluções foram preparadas e analisadas em três dias diferentes. Os resultados obtidos são descritos na **Tabela 4.5**.

Tabela 4.5 – Dados empregados na construção da curva analítica de galactose para o doseamento espectrofotométrico de açúcares totais.

Concentração de galactose (mg/mL)	Absorvância a 490 nm das repetições		
1,5	1,127	1,136	1,132
1,2	0,956	0,962	0,965
0,9	0,725	0,753	0,753
0,6	0,516	0,557	0,557
0,3	0,258	0,278	0,270

A regressão linear realizada pelo método dos mínimos quadrados forneceu coeficientes de determinação (r^2) de 0,9958, 0,9927 e 0,9907 para as três retas. A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos dessas retas eram equivalentes e, portanto, foi traçada uma curva média (**Figura 4.14**) com r^2 de 0,9921.

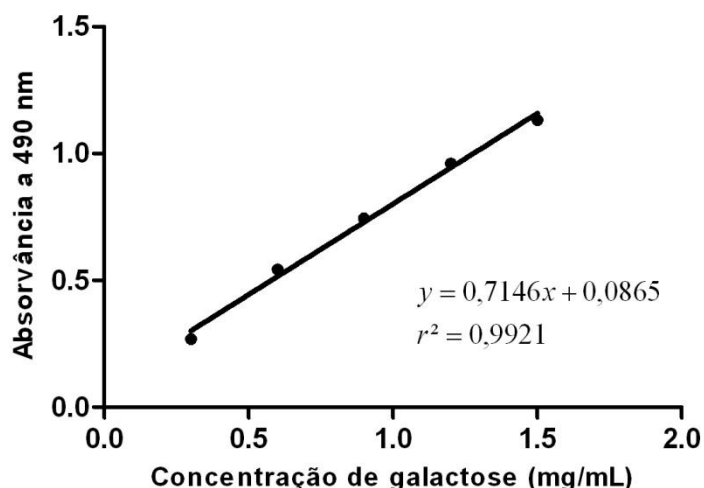


Figura 4.14 – Curva analítica para quantificação espectrofotométrica de açúcares totais empregando galactose como substância de referência e detecção em $\lambda=490$ nm.

Os teores médios de açúcares totais presentes nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 foram determinados em relação ao padrão de galactose e estão dispostos na **Tabela 4.6**.

Tabela 4.6 – Teores médios de açúcares totais, expressos em termos de galactose, nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2.

Frações	Açúcares totais (% $\pm$ DP, $n=3$)
B1	30,32 $\pm$ 1,32
B2	26,87 $\pm$ 0,82
Fra B1	29,44 $\pm$ 1,12
Fra B2	34,69 $\pm$ 0,81

4.6.4 Quantificação de grupos sulfato

A quantificação de grupos sulfato nas frações enriquecidas em polissacarídeos foi realizada pelo método descrito por Dodgson (1961) e Dodgson & Price (1962). O procedimento baseia-se na precipitação dos grupos sulfato (liberados após hidrólise dos polissacarídeos) na forma de sulfato de bário, utilizando gelatina como agente estabilizante. De acordo com Dodgson (1961), a turbidez gerada pode ser avaliada por leituras espectrofotométricas em λ 360 ou 500 nm.

Visando avaliar a seletividade do método em relação a possíveis interferentes contidos nas amostras, foram traçados espectros de varredura (nos comprimentos de onda de 200 a 800 nm) para soluções de leitura de B1, B2, Fra B1 e Fra B2 com e sem a adição dos reagentes (ácido tricloroacético a 4% m/v e gelatina-cloreto de bário). Optou-se por trabalhar no comprimento de onda de 500 nm, no qual não existe interferência na leitura espectrofotométrica, devido à absorção em $\lambda=360$ nm apresentada para as soluções das frações sem a adição dos reagentes. A absorvância detectada pode estar relacionada à formação de derivados durante a etapa de hidrólise, possivelmente relacionados aos açúcares constituintes (DODGSON & PRICE, 1962). Os espectros para B1, B2, Fra B1 e Fra B2 foram idênticos. A título de ilustração, apresenta-se o espectro obtido para B1 (**Figura 4.15**).

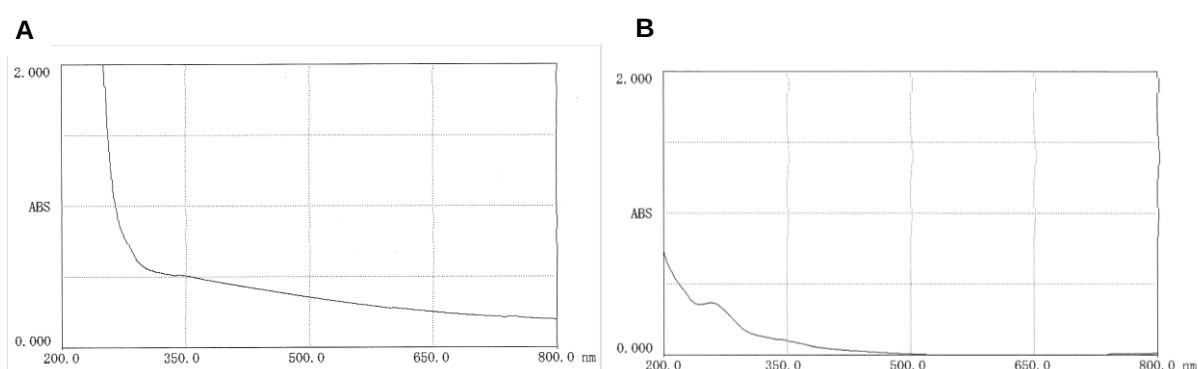


Figura 4.15 – Espectros de varredura no UV/VIS para a solução de leitura de B1 com (A) e sem (B) a adição dos reagentes para quantificação de sulfato.

Dessa forma, construiu-se uma curva analítica plotando a absorvância *versus* a concentração dos íons sulfato. Foram empregadas soluções de sulfato de potássio

contendo 20 a 200 μg de SO_4^{2-} /200 μL . As soluções foram preparadas e analisadas em três dias diferentes. Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 4.7**.

Tabela 4.7 – Dados empregados na construção da curva analítica de íons SO_4^{2-} para o doseamento turbidimétrico de sulfato.

μg de íons SO_4^{2-} /200 μL	Absorvância a 500 nm das repetições		
200	0,448	0,441	0,446
120	0,292	0,279	0,285
80	0,203	0,202	0,193
40	0,099	0,101	0,099
20	0,035	0,039	0,043

A partir da regressão linear (determinada pelo método dos mínimos quadrados) foram obtidos coeficientes de determinação (r^2) de 0,9919, 0,9941 e 0,9972 para as três retas. A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos dessas retas eram equivalentes, sendo então traçada uma curva média (**Figura 4.16**) com r^2 de 0,9941.

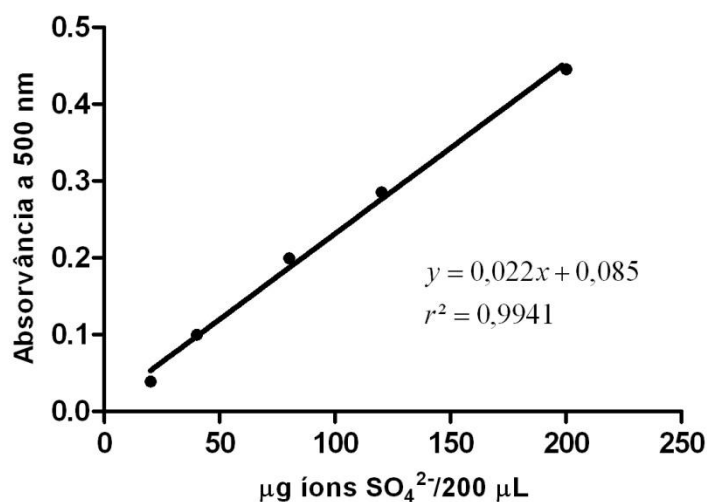


Figura 4.16 – Curva analítica para quantificação espectrofotométrica de sulfato empregando sulfato de potássio como substância de referência e detecção em $\lambda=500$ nm.

Os teores médios de grupos sulfatos presentes nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 foram determinados após a hidrólise dos polissacarídeos e estão dispostos na **Tabela 4.8**.

Tabela 4.8 – Teores médios de grupos sulfato, expressos em termos de íons SO_4^{2-} , nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2.

Frações	Grupos sulfato (% $\pm$ DP, $n=3$)
B1	11,70 $\pm$ 0,21
B2	8,94 $\pm$ 0,25
Fra B1	11,57 $\pm$ 0,15
Fra B2	10,06 $\pm$ 0,30

4.6.5 Quantificação de proteínas totais

O método colorimétrico descrito por Bradford (1976), com adaptações para microplaca (ZOR & SELINGER, 1996; KRUGER, 2002), foi utilizado para avaliar a presença de proteínas nas frações enriquecidas em polissacarídeos. Este método é bastante vantajoso devido à sua simplicidade, rapidez e sensibilidade, além de não haver interferência de carboidratos na análise. Em pH ácido, três formas do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 são encontradas. A forma vermelha, com carga positiva, possui máximo de absorção em $\lambda=470$ nm. A forma verde possui absorvância máxima em $\lambda=650$ nm. A forma azul, que possui carga negativa, apresenta seu máximo de absorção em $\lambda=595$ nm. As estruturas químicas das três formas do corante estão ilustradas na **Figura 4.17**. No ensaio proposto por Bradford (1976), as proteínas interagem com a forma azul do corante, originando um complexo que estabiliza a mesma e reduz as quantidades das demais formas. Assim, há um aumento da absorvância em $\lambda=595$ nm, o que permite estimar a concentração de proteínas na amostra (CHIAL *et al.*, 1993). A carga negativa da forma azul do corante interage com as cadeias laterais de resíduos de lisina e arginina nas proteínas. Interações hidrofóbicas com o restante da cadeia do corante também ocorrem (CHIAL *et al.*, 1993).

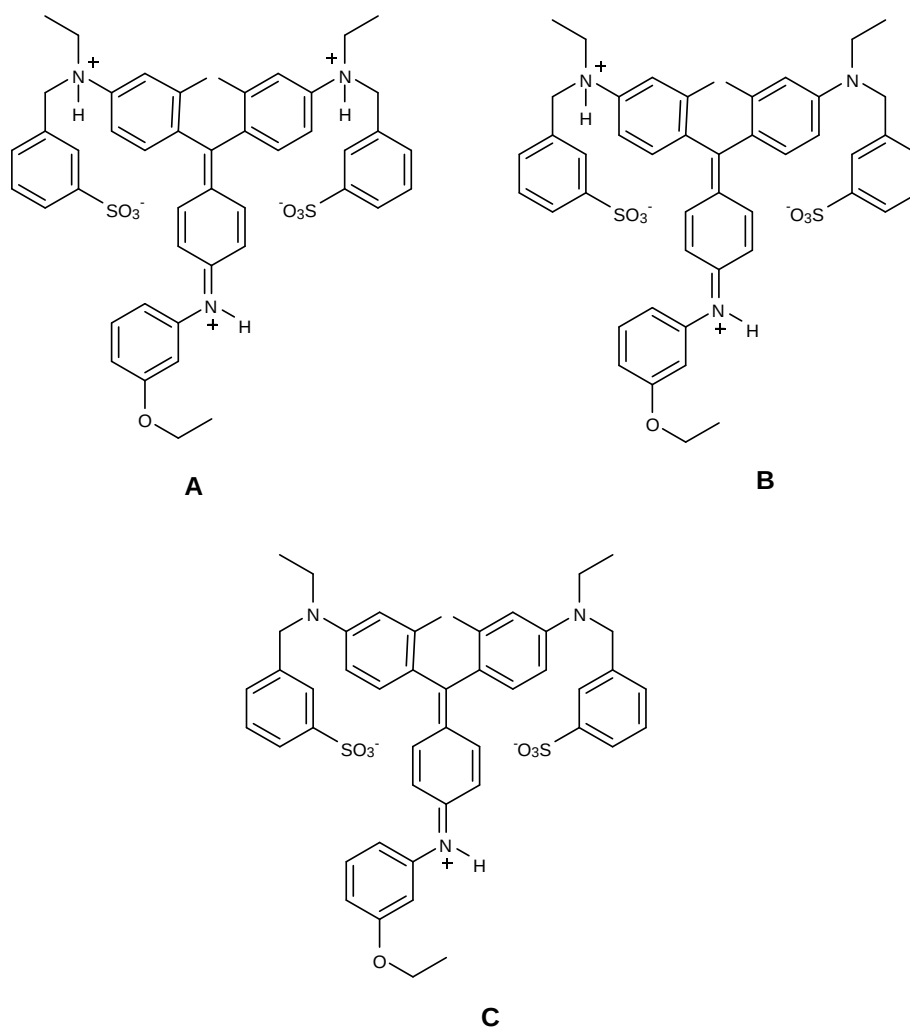


Figura 4.17 – Formas do corante Coomassie Brilliant Blue G-250. Forma vermelha (A), $\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm; forma verde (B), $\lambda_{\text{máx}}$ 650 nm; forma azul (C), $\lambda_{\text{máx}}$ 595 nm.

Foram traçados espectros de varredura (λ de 230 a 800 nm) para soluções de leitura de B1 e B2 com e sem a adição do reagente de cor (solução contendo o corante Coomassie Brilliant Blue G-250), para avaliar a seletividade do método em relação a possíveis interferentes contidos nas amostras. Os espectros obtidos não indicam interferência das matrizes no comprimento de onda de leitura ($\lambda=595$ nm). Os espectros registrados para B1, B2, Fra B1 e Fra B2 foram idênticos. A título de ilustração, o espectro obtido para B1 está reproduzido na **Figura 4.18**.

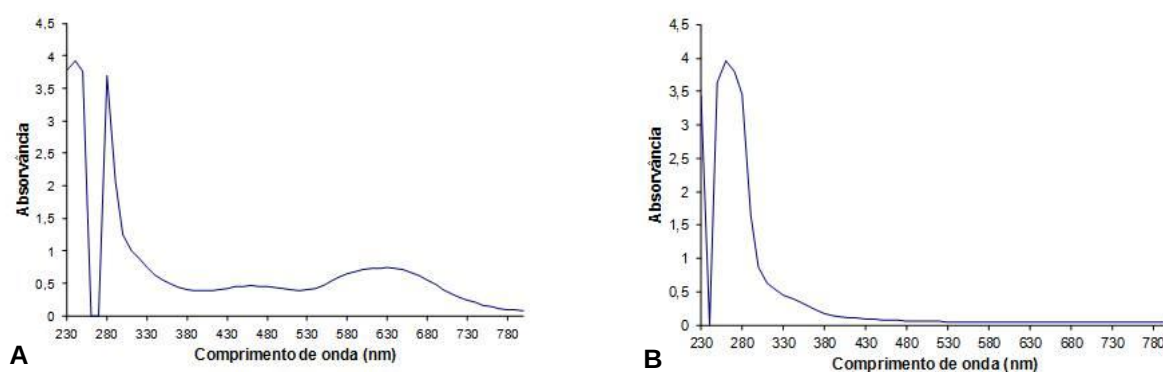


Figura 4.18 – Espectros de varredura no UV/VIS para a solução de leitura de B1 com (A) e sem (B) a adição do reagente de cor para a quantificação de proteínas totais.

A curva analítica foi construída com soluções de albumina de soro bovino contendo 1 a 5 μg de albumina/50 μL . As soluções foram preparadas e analisadas em três dias diferentes. Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 4.9**.

Tabela 4.9 – Dados empregados na construção da curva analítica de albumina de soro bovino para o doseamento espectrofotométrico de proteínas totais.

μg de albumina/50 μL	Absorvância a 595 nm das repetições		
5	0,539	0,556	0,561
4	0,463	0,470	0,473
3	0,364	0,370	0,374
2	0,244	0,268	0,253
1	0,124	0,127	0,128

Obtiveram-se coeficientes de determinação (r^2) de 0,9919, 0,9910 e 0,9942 para as três retas, a partir da regressão linear dos dados obtidos. A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos dessas retas eram equivalentes e, portanto, foi traçada uma curva média (**Figura 4.19**) com r^2 de 0,9910.

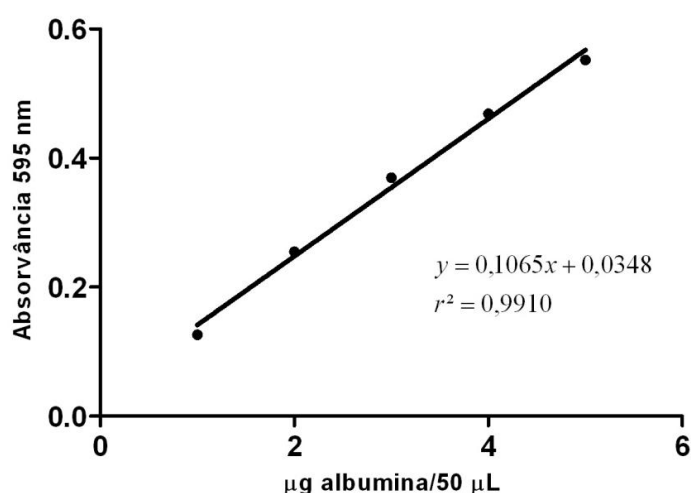


Figura 4.19 – Curva analítica para quantificação espectrofotométrica de proteínas totais empregando albumina de soro bovino como substância de referência e detecção em $\lambda=595$ nm.

Os teores médios de proteínas totais presentes nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 foram determinados em relação ao padrão de albumina de soro bovino e estão dispostos na **Tabela 4.10**.

Tabela 4.10 – Teores médios de proteínas totais, expressos em termos de albumina de soro bovino, nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2.

Frações	Proteínas totais (% $\pm$ DP, $n=3$)
B1	3,37 $\pm$ 0,01
B2	2,49 $\pm$ 0,04
Fra B1	3,78 $\pm$ 0,02
Fra B2	3,14 $\pm$ 0,03

4.6.6 Quantificação de ácidos urônicos

A presença de ácidos urônicos nas frações enriquecidas em polissacarídeos foi avaliada pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi & Carpita (1991). O fundamento químico do método é similar aquele descrito para a quantificação de açúcares totais. Em meio fortemente ácido, carboidratos formam derivados furânicos que reagem com determinados compostos produzindo complexos coloridos (CUI, 2005). No caso do ensaio proposto por Filisetti-Cozzi & Carpita (1991), o reagente

de cor utilizado é o *m*-hidroxidifenil, que reage especificamente com os derivados de ácidos urônicos produzindo uma coloração rosa (CUI, 2005). O tetraborato de sódio adicionado ao ácido sulfúrico aumenta a conversão dos açúcares em seus derivados reativos (GREGORY, 1960). Já o ácido sulfâmico/sulfamato de potássio atua minimizando a interferência dos açúcares neutros (BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, 1973; FILISETTI-COZZI & CARPITA, 1991).

Visando avaliar a seletividade do método em relação a possíveis interferentes contidos nas amostras, foram traçados espectros de varredura (λ de 200 a 800 nm) para soluções de leitura de B1, B2, Fra B1 e Fra B2 com e sem a adição do reagente de cor (*m*-hidroxidifenil). Considerando-se a ocorrência de reação de *browning* (escurecimento das soluções) durante o aquecimento, utilizou-se uma solução de compensação para cada amostra a ser quantificada. Esse efeito é observado devido ao elevado conteúdo de açúcares neutros nas amostras e está relacionado com a formação de derivados desses compostos em presença de ácido concentrado. Os espectros registrados para B1, B2, Fra B1 e Fra B2 foram idênticos, mostrando uma pequena absorção em $\lambda=525$ nm para as soluções sem a adição de *m*-hidroxidifenil. A título de ilustração, mostra-se o espectro obtido para B1 (**Figura 4.20**).

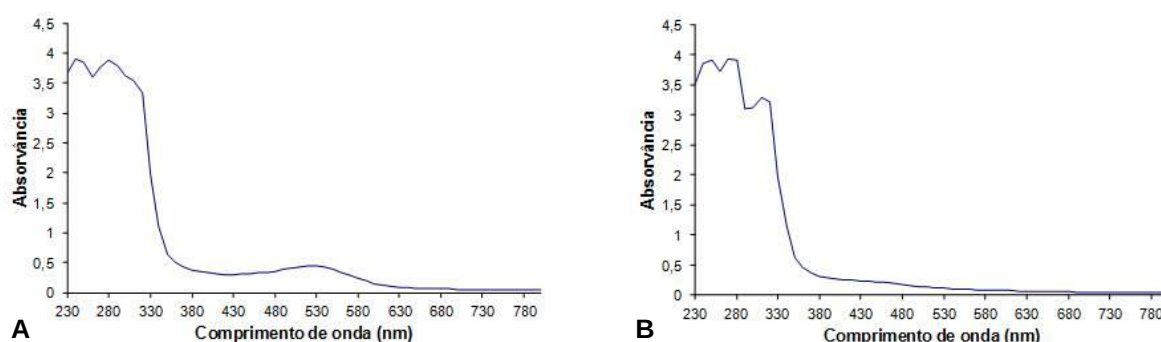


Figura 4.20 – Espectros de varredura no UV/VIS para a solução de leitura de B1 com (A) e sem (B) a adição do reagente de cor para a quantificação de ácidos urônicos.

Procedeu-se, então, a construção de uma curva analítica considerando a relação entre a absorvância e a concentração de ácidos urônicos. Foram empregadas soluções de ácido glicurônico com conteúdo de ácido urônico variando de 9 a 31,5 μg em 400 μL . As soluções foram preparadas e analisadas em três dias diferentes. Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 4.11**.

Tabela 4.11 – Dados empregados na construção da curva analítica de ácido glicurônico para o doseamento espectrofotométrico de ácidos urônicos.

μg de ácido glicurônico/400 μL	Absorvância a 525 nm das repetições		
31,5	0,325	0,321	0,324
27,0	0,264	0,269	0,265
22,5	0,212	0,211	0,210
18,0	0,175	0,162	0,163
13,5	0,128	0,129	0,125
9,0	0,085	0,083	0,084

A regressão linear dos dados obtidos, realizada pelo método dos mínimos quadrados, forneceu coeficientes de determinação (r^2) de 0,9924, 0,9915 e 0,9925 para as três retas. A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos dessas retas eram equivalentes e, portanto, foi traçada uma curva média (**Figura 4.21**) com r^2 de 0,9928.

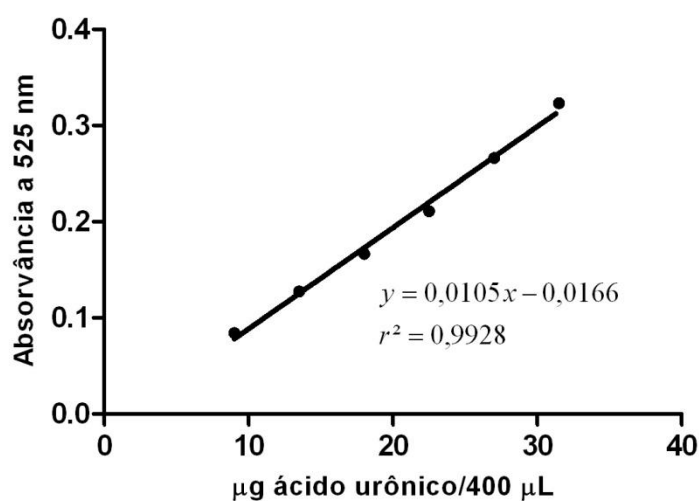


Figura 4.21 – Curva analítica para quantificação espectrofotométrica de ácidos urônicos empregando ácido glicurônico como substância de referência e detecção em $\lambda=525$ nm.

Os teores médios de ácidos urônicos presentes nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2, expressos como ácido glicurônico, estão dispostos na **Tabela 4.12**.

Tabela 4.12 – Teores médios de ácidos urônicos, expressos como ácido glicurônico, nas frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2.

Frações	Ácidos urônicos (% $\pm$ DP, $n=3$)
B1	5,07 $\pm$ 0,10
B2	4,19 $\pm$ 0,05
Fra B1	5,06 $\pm$ 0,11
Fra B2	4,17 $\pm$ 0,08

4.6.7 Determinação da massa molecular aparente dos polissacarídeos

A massa molecular (MM) de polissacarídeos é um parâmetro importante e que influencia várias de suas propriedades físico-químicas, como a solubilidade em água e viscosidade. Porém, a determinação exata da massa desses polímeros não é uma tarefa fácil. Polissacarídeos são polidispersos em termos de massa molecular, sendo que a polidispersão depende de fatores ambientais (que interferem em suas sínteses) e das condições de isolamento utilizadas (CUI, 2005).

Várias técnicas são empregadas para determinar a massa molecular de polissacarídeos (CUI, 2005). A cromatografia de alta eficiência de exclusão por tamanho é uma das técnicas mais antigas e mais utilizadas, principalmente devido à sua simplicidade. O método utiliza uma coluna cromatográfica em que a fase estacionária é um gel com poros de tamanhos bem definidos. Assim, quanto maior o volume da molécula, menos retida nos poros da coluna ela será, levando a um menor tempo de retenção. Padrões de massas moleculares conhecidas são utilizados para calibrar a coluna e a massa molecular do polissacarídeo de interesse é determinada comparando-se os tempos de retenção encontrados para os padrões e as amostras. Porém, os arranjos tridimensionais e a presença de grupos carregados podem interferir no processo. Assim, diferenças estruturais entre os padrões e as amostras podem resultar em erros das massas moleculares determinadas (CUI, 2005). Portanto, o ideal é que diferentes técnicas sejam utilizadas para confirmar os valores encontrados.

No presente trabalho uma estimativa da massa molecular dos polissacarídeos de *L. muelleri* foi feita utilizando uma coluna de filtração molecular e padrões de pululanas por HPSEC. As pululanas são homopolissacarídeos lineares de glicose, constituídos por subunidades de maltotriose em ligações (1→6) e (1→4) (**Figura 4.22**). Devido à ausência de cromóforos, utiliza-se detecção por índice de refração, sem necessidade de derivatização.

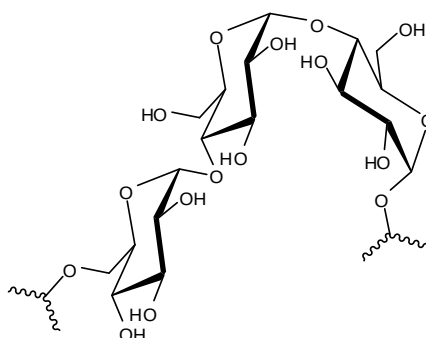


Figura 4.22 – Subunidade de maltotriose constituinte das pululanas.

Construiu-se uma curva de calibração plotando o logaritmo das massas moleculares dos padrões de pululanas *versus* os respectivos tempos de retenção determinados por HPSEC. Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 4.13**.

Tabela 4.13 – Dados empregados na construção da curva de calibração para a estimativa da massa molecular dos polissacarídeos por HPSEC, utilizando padrões de pululanas.

Padrão	Massa Molecular (Da)	log MM	Tempo de retenção (média ± DP, <i>n</i> =3)
P-800	788000	5,90	15,23 ± 0,13
P-400	404000	5,61	15,98 ± 0,15
P-200	212000	5,33	16,31 ± 0,29
P-100	112000	5,05	17,05 ± 0,10
P-50	47300	4,67	18,02 ± 0,19
P-20	22800	4,36	18,78 ± 0,09
P-10	11800	4,07	19,61 ± 0,20
P-5	5900	3,77	20,21 ± 0,16

A linearidade do método foi comprovada pela análise de regressão linear, obtida pelo método dos mínimos quadrados, que apresentou r^2 de 0,9959. A curva resultante pode ser visualizada na **Figura 4.23**.

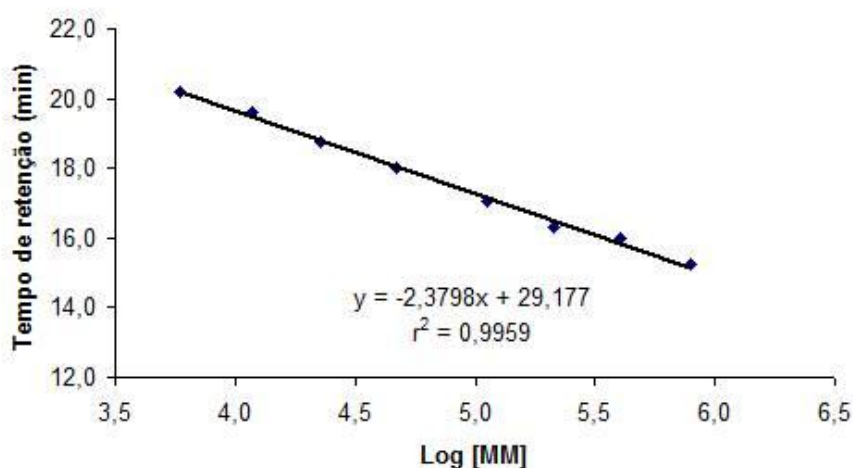


Figura 4.23 – Curva de calibração obtida com padrões de pululanas para a determinação das massas moleculares aparentes dos polissacarídeos de *L. muelleri*.

A partir da equação da reta, as massas moleculares dos polissacarídeos das frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 de *L. muelleri* foram estimadas. Os tempos de retenção foram determinados em relação ao pico majoritário dos cromatogramas. Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 4.14**.

Tabela 4.14 – Massa molecular aparente dos polissacarídeos das frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 de *L. muelleri*.

Fração	Tempo de retenção (média ± DP, n=3)	Massa Molecular (média em kDa ± DP, n=3)
B1	18,07 ± 0,03	46,34 ± 1,53
B2	18,15 ± 0,10	43,01 ± 4,26
Fra B1	17,95 ± 0,05	52,49 ± 2,57
Fra B2	17,80 ± 0,08	60,70 ± 4,90

4.6.8 Avaliação da composição química dos polissacarídeos por cromatografia gasosa

A identificação dos açúcares constituintes de um polissacarídeo é uma das informações mais relevantes para sua caracterização estrutural. A composição monossacarídica possui estreita relação com a classificação taxonômica (CHOPIN et

al., 1999; FERREIRA *et al.*, 2012). Ou seja, espécies relacionadas tendem a possuir polissacarídeos do mesmo tipo.

A primeira etapa para identificar os açúcares constituintes de um polissacarídeo é a hidrólise das ligações glicosídicas. Várias condições estão descritas na literatura, sendo a hidrólise com ácido trifluoroacético uma das mais utilizadas (SANZ & MARTÍNEZ-CASTRO, 2007; CUI, 2005; FARIAS *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 1993). É importante ressaltar que as condições de hidrólise devem ser suficientes para promover a quebra completa das ligações glicosídicas sem que haja a degradação da amostra (CUI, 2005).

Após a hidrólise, os açúcares são analisados por técnicas cromatográficas que permitam sua separação e quantificação. As técnicas comumente utilizadas são a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CUI, 2005). A ausência de cromóforos dificulta a análise desses compostos por CLAE, uma vez que a maioria dos equipamentos possui detecção no ultravioleta. Porém, outros detectores, como índice de refração e espalhamento de luz, possibilitam essa análise. Além disso, alguns métodos de derivatização estão disponíveis para facilitar o uso de CLAE/UV nessas quantificações (TAPIE *et al.*, 2008). A GC é uma técnica já bem estabelecida para essas análises. Dentre suas principais vantagens está a alta sensibilidade, requerendo apenas pequenas quantidades de amostra. Porém, a técnica requer a preparação de derivados voláteis.

As reações de derivatização têm como objetivo a substituição dos grupos polares da molécula para aumentar a volatilidade. Várias opções de derivados são possíveis. Um dos métodos mais vantajosos é a formação de acetatos de alditóis, pois a redução dos monossacarídeos impede a formação de anômeros e, conseqüentemente, de múltiplos picos (RUIZ-MATUTE *et al.*, 2011). O processo consiste na redução do grupo carbonila com NaBH_4 para a formação dos alditóis, seguindo-se acetilação com anidrido acético (**Figura 4.24**).

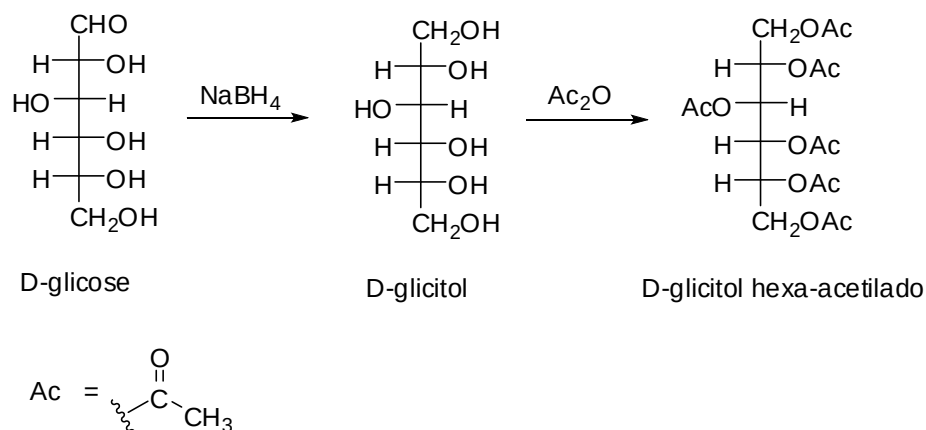
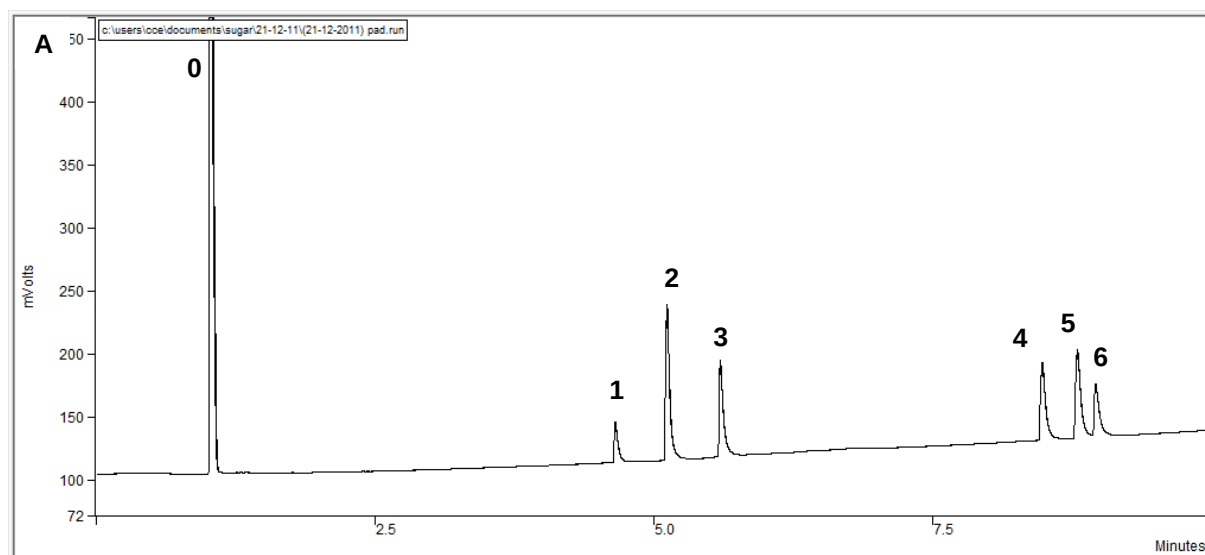
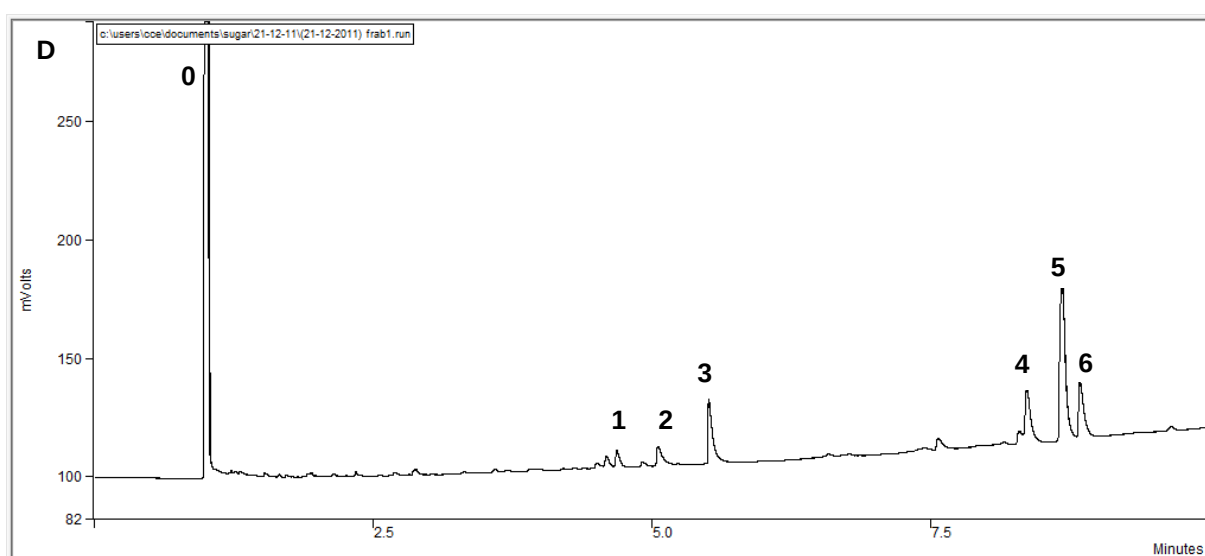
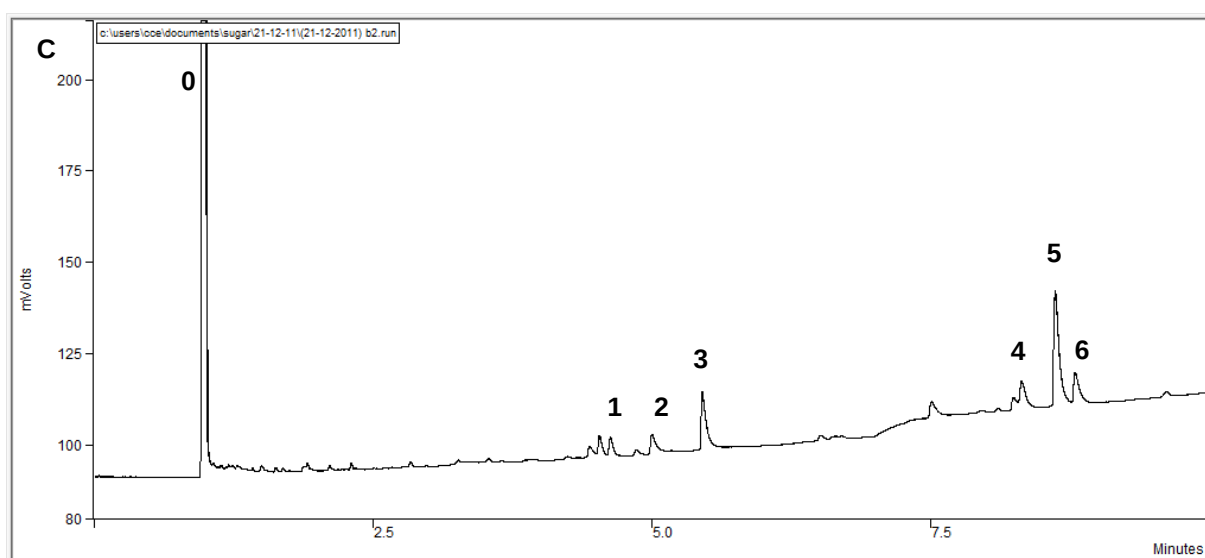
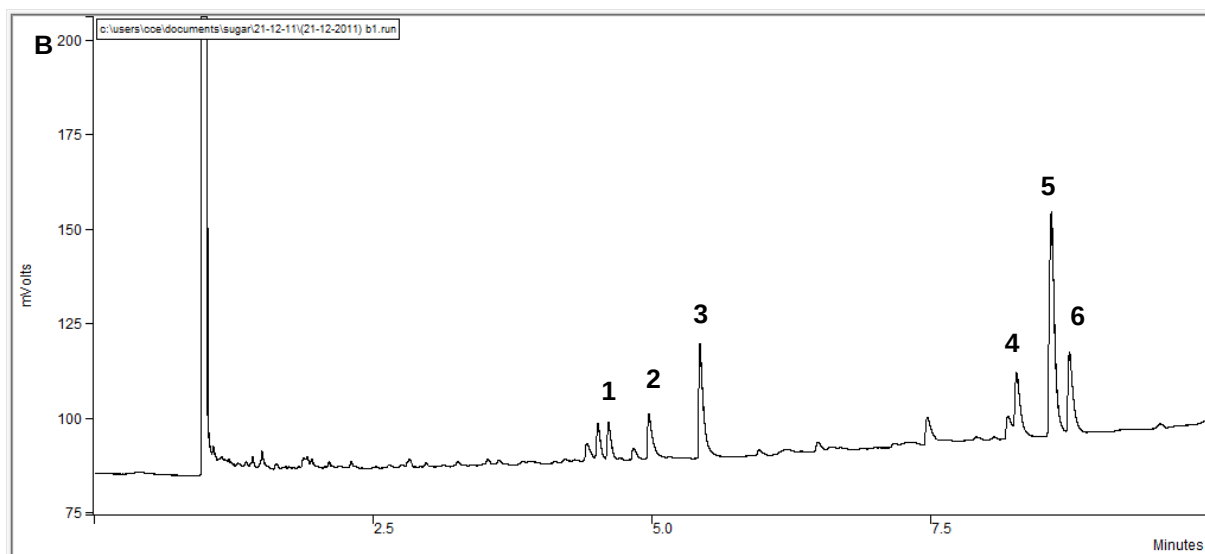


Figura 4.24 – Representação esquemática da formação de acetatos de alditóis.

Amostras das frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 de *L. muelleri* foram hidrolisadas e derivatizadas a acetatos de alditóis para análise por cromatografia gasosa. Padrões de monossacarídeos (glicose, galactose, xilose, manose, ramnose e arabinose) foram submetidos às mesmas reações para determinação dos tempos de retenção. Os cromatogramas obtidos encontram-se na **Figura 4.25**.





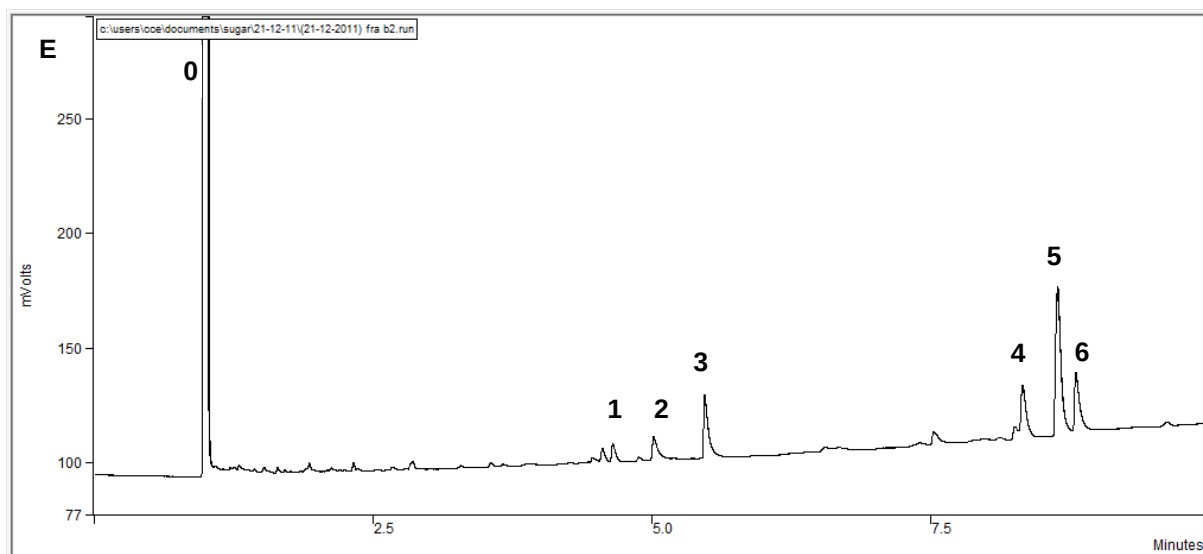


Figura 4.25 – Cromatogramas, obtidos por GC-FID, para os acetatos de alditóis de monossacarídeos de referência (A) e de açúcares provenientes da hidrólise ácida das frações B1 (B), B2 (C), Fra B1 (D) e Fra B2 (E).

0: CHCl_3 (solvente); 1: ramnose; 2: arabinose; 3: xilose; 4: manose; 5: galactose; 6: glicose.

A composição monossacarídica das amostras, expressa em porcentagens molares relativas (% mol), foi determinada a partir da RMR de cada açúcar (Parte Experimental, item 3.10.8.4), conforme descrito por Ferraz (1991). Esse método corrige as diferenças de respostas fornecidas pelo detector aos diferentes açúcares e possíveis perdas que possam ter ocorrido durante a derivatização (CUI, 2005; FERRAZ, 1991). Os dados obtidos estão dispostos na **Tabela 4.15**, que também apresenta os resultados de todas as caracterizações químicas efetuadas.

Tabela 4.15 – Análise da composição química das frações B1, B2, Fra B1 e Fra B2 de *L. muelleri*.

Caracterização estrutural	B1	B2	Fra B1	Fra B2
Açúcares totais (% $\pm$ DP)	30,32 $\pm$ 1,32	26,87 $\pm$ 0,82	29,44 $\pm$ 1,12	34,69 $\pm$ 0,81
Grupos sulfato (% $\pm$ DP)	11,70 $\pm$ 0,21	8,94 $\pm$ 0,25	11,57 $\pm$ 0,15	10,06 $\pm$ 0,30
Proteínas totais (% $\pm$ DP)	3,37 $\pm$ 0,01	2,49 $\pm$ 0,04	3,78 $\pm$ 0,02	3,14 $\pm$ 0,03
Ácidos urônicos (% $\pm$ DP)	5,07 $\pm$ 0,10	4,19 $\pm$ 0,05	5,06 $\pm$ 0,11	4,17 $\pm$ 0,08
Massa molecular (kDa)	46,34	43,01	52,49	60,70
Açúcares constituintes (mol %)				
Ramnose	12,64	12,38	8,27	9,38
Arabinose	4,26	4,06	2,93	3,78
Xílose	13,59	14,13	11,30	11,58
Manose	15,14	14,70	18,19	17,97
Galactose	34,17	36,54	37,80	34,46
Glicose	20,19	18,20	21,51	22,82

Os resultados indicam composições químicas similares entre as frações, com pequenas diferenças que podem estar relacionadas aos processos de obtenção (extração, purificação, secagens). Os dados obtidos corroboram a existência de um polissacarídeo sulfatado majoritário no granulado de *L. muelleri*, o qual foi isolado pelos processos utilizados no presente trabalho nas frações B1 e B2. Este polissacarídeo constitui uma xilogalactana, possuindo também altos teores de glicose e manose. A razão entre xilose e galactose é de 1:3, proporção similar aos resultados descritos para xilogalactanas isoladas de *Lithothamnion heterocladum* (NAVARRO *et al.*, 2011) e também para outras algas calcárias da ordem Corallinales (BILAN & USOV, 2001).

O teor de proteínas em todas as frações foi menor que 4%, podendo ser considerado baixo em relação aos resultados encontrados para os polissacarídeos de outra espécie do mesmo gênero (NAVARRO *et al.*, 2011). Utilizando o método de Lowry, Navarro *et al.* (2011) determinaram teores de proteínas acima de 5% para as diferentes frações enriquecidas em polissacarídeos obtidas a partir de *Lithothamnion heterocladum*.

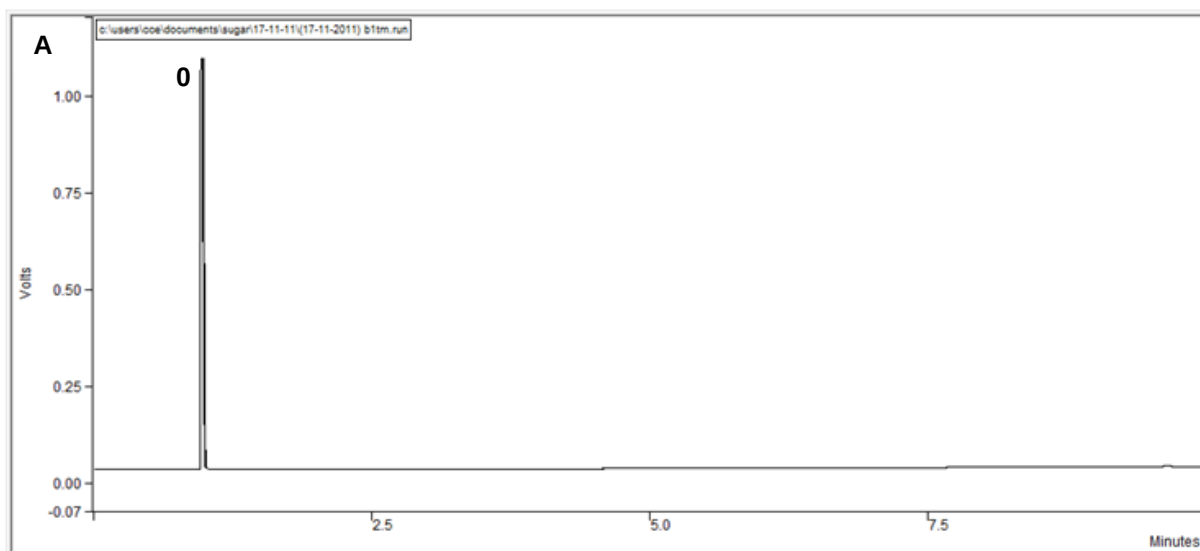
De forma geral, a composição química dos polissacarídeos isolados de *Lithothamnion heterocladum* por Navarro *et al.* (2011) mostrou-se similar aos

resultados obtidos para os polissacarídeos de *L. muelleri*, porém com menores massas moleculares (10,9 e 12,1 kDa para as duas principais frações) e teores de ácidos urônicos (em torno de 2% em uma das frações e apenas traços na outra). Essas diferenças podem estar relacionadas ao metabolismo das espécies e às condições de extração utilizadas. A extração ácida utilizada por Navarro *et al.* (2011) pode ocasionar degradação dos polissacarídeos, reduzindo suas massas moleculares, além de dificultar a extração de açúcares ácidos. Já a extração básica adotada para a extração dos polissacarídeos de *L. muelleri* proporcionou uma menor degradação das cadeias polissacarídicas, resultando em maior massa molecular e um maior teor de ácidos urônicos. Os polissacarídeos de *L. muelleri* assemelham-se àqueles encontrados em outras algas calcárias, confirmando que a composição monossacarídica de polissacarídeos de algas possui uma estreita relação com sua classificação taxonômica (CHOPIN *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2012).

Existem poucos trabalhos na literatura relatando a composição química de algas calcárias. Quando se considera espécies de algas calcárias não articuladas (que possuem todo o talo algal calcificado), o número é ainda menor. Para a família Hapalidiaceae, apenas relatos da composição polissacarídica de *Lithothamnion heterocladum* (NAVARRO *et al.*, 2011) e *Lithothamnion phymatodeum* (USOV *et al.*, 1995 *apud* BILAN & USOV, 2001) foram encontrados na literatura, sendo galactose, xilose, glicose e ácidos urônicos os componentes monossacarídicos dos polímeros das duas espécies (NAVARRO *et al.*, 2011). Portanto, este é o primeiro relato do isolamento e caracterização química de uma xilogalactana sulfatada de *L. muelleri*, que contém também glicose, manose e ácidos urônicos em sua composição. O polissacarídeo de *L. muelleri* caracterizado no presente trabalho tem composição química similar àqueles obtidos de outras espécies da mesma família e também de outras espécies de algas calcárias (BILAN & USOV, 2001). Os dados de composição química obtidos para a espécie *L. muelleri* contribuem para um melhor conhecimento da família Hapalidiaceae, ainda pouco estudada.

4.6.8.1 Hidrólise parcial dos polissacarídeos de *L. muelleri*

A administração do suplemento alimentar produzido a partir da alga *L. muelleri* se dá por via oral. Assim, é importante considerar que os polissacarídeos estão submetidos a meio ácido, que pode induzir quebras na molécula. Visando avaliar a extensão da degradação das cadeias polissacarídicas no meio estomacal, realizou-se uma hidrólise ácida parcial mimetizando as condições gástricas. Essa hidrólise foi conduzida considerando a temperatura corporal (37 °C), o tempo médio de permanência no estômago (3 h) e um pH próximo do estomacal (pH 2). As condições utilizadas foram as mesmas descritas por Mellinger *et al.* (2008). Os hidrolisados parciais obtidos a partir de B1 e B2 foram submetidos à derivatização e analisados por GC (**Figura 4.26**).



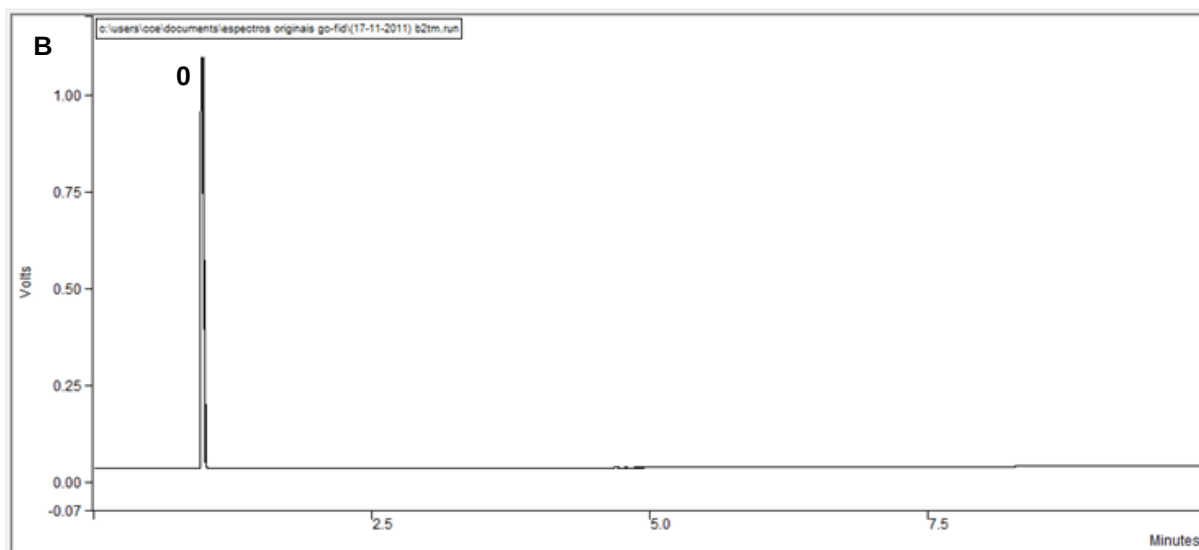


**Figura 4.26 – Cromatogramas, obtidos por GC-FID, para os hidrolisados parciais derivatizados de B1 (A) e B2 (B).
0: CHCl₃ (solvente).**

Não foram detectados picos com tempos de retenção equivalentes aos produtos de derivatização dos monossacarídeos galactose, glicose, manose, xilose, arabinose e ramnose, ou picos com tempos de retenção distintos dos padrões. Considerando a alta sensibilidade do método, pode-se afirmar que não houve formação de monossacarídeos. Portanto, pode-se inferir que a hidrólise estomacal dos polissacarídeos de *L. muelleri* promove apenas quebras parciais da molécula, formando oligossacarídeos não detectados nas condições analíticas empregadas.

Os resultados encontrados são surpreendentes, uma vez que polissacarídeos são conhecidos pela labilidade de suas ligações glicosídicas em meio ácido. No estudo realizado por Mellinger *et al.* (2008), arabinogalactanas isoladas da planta *Phyllanthus niruri* foram submetidas à hidrólise parcial mimetizando as condições gástricas. Os autores detectaram a liberação de monossacarídeos, especialmente das unidades de arabinose. As diferenças encontradas entre o presente trabalho e os resultados de Mellinger *et al.* (2008) devem estar relacionadas com as composições químicas dos polissacarídeos estudados. Polissacarídeos que contêm ácidos urônicos em sua composição, como os das frações B1 e B2, são mais resistentes à hidrólise ácida (CUI, 2005; MELLINGER *et al.*, 2008). Além disso, a composição dos polissacarídeos de *L. muelleri* é muito diferente daqueles de *Phyllanthus niruri*, sendo que outros fatores estruturais podem estar relacionados aos

resultados encontrados, tais como a presença de grupos sulfato e de elementos minerais associados à estrutura do polímero.

Porém, é importante lembrar que, além do meio ácido estomacal, essas moléculas também estão sujeitas à ação de enzimas e bactérias intestinais. Assim, estudos mais detalhados sobre o metabolismo dos polissacarídeos de *L. muelleri* são necessários.

4.7 Avaliação da atividade antiartrítica de *L. muelleri*

L. muelleri é empregada como suplemento alimentar devido a seu elevado teor de cálcio. Segundo relato verbal do fabricante do produto Vitalidade 50+[®], constituído pelo granulado da alga, os usuários relatam melhoria de processos inflamatórios, incluindo artrite reumatóide. Em trabalho anterior de nosso grupo, foi demonstrada a atividade inibitória do rolamento de leucócitos para frações ricas em polissacarídeos da espécie (SOARES, 2009). Assim, um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a atividade antiartrítica do granulado de *L. muelleri* e das frações enriquecidas em polissacarídeos, empregando modelo *in vivo* de AIA.

O modelo experimental de AIA tem grande validade no estudo dos mecanismos envolvidos na patologia da artrite reumatóide. Alterações do comportamento de diversos tipos celulares e mediadores inflamatórios são detectados na inflamação articular. Com o modelo de AIA é possível avaliar o papel de cada um desses componentes no desenvolvimento da doença (COELHO, 2007). Além disso, o modelo experimental possui muitas similaridades com a artrite reumatóide humana, o que lhe proporciona um bom papel preditivo para a avaliação de novos tratamentos (POHLERS *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2006).

No modelo de AIA empregado, os animais são inicialmente imunizados com a proteína albumina de soro bovino metilada associada ao adjuvante completo de Freund, o que dirige a resposta imune celular para um perfil predominantemente Th1 (POHLERS *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2006). Após a imunização é feito o desafio

com mBSA (10 µg/cavidade), observando-se um aumento significativo no número de neutrófilos na cavidade articular e nos tecidos periarticulares, além do aumento na intensidade da hipernocicepção relativa à movimentação articular. Também se observa um aumento na concentração de citocinas e quimiocinas relacionadas ao recrutamento celular, como CXCL1, CXCL2 e TNF- α (COELHO *et al.*, 2008). A microscopia intravital é de grande utilidade para complementar as informações obtidas, permitindo avaliar as alterações no rolamento e adesão celular no endotélio vascular.

No caso dos animais imunizados e desafiados, nota-se um aumento tanto no rolamento quanto na adesão (COELHO *et al.*, 2008). De acordo com os resultados relatados por Coelho *et al.* (2008), a maioria dos parâmetros inflamatórios de interesse apresenta picos na 24^a hora após o desafio, tendo sido este intervalo de tempo adotado para a avaliação dos animais no presente estudo.

Uma substância com potencial atividade antiartrítica deve reduzir o recrutamento celular, o que pode estar relacionado à diminuição de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo. Além disso, deve-se observar a redução na hipernocicepção mecânica e também no infiltrado inflamatório nos tecidos periarticulares.

Assim, realizou-se um experimento inicial para avaliar o melhor período de tratamento, cinco ou dez dias, com o granulado de *L. muelleri* na dose de 100 mg/kg. Observou-se que, em relação aos animais artríticos, tanto o tratamento por 5 dias como o tratamento por 10 dias reduziram de forma significativa a migração de neutrófilos para a cavidade articular (**Figura 4.27 A**) e tecidos periarticulares (**Figura 4.27 B**), além dos níveis de CXCL1 (**Figura 4.27 C**) e CXCL2 (**Figura 4.27 D**) nos tecidos periarticulares. Porém, apenas o tratamento por 10 dias induziu uma redução estatisticamente significativa na hipernocicepção mecânica (**Figura 4.27 E**). Assim, os demais experimentos foram conduzidos utilizando o período de dez dias de tratamento anteriormente ao desafio.

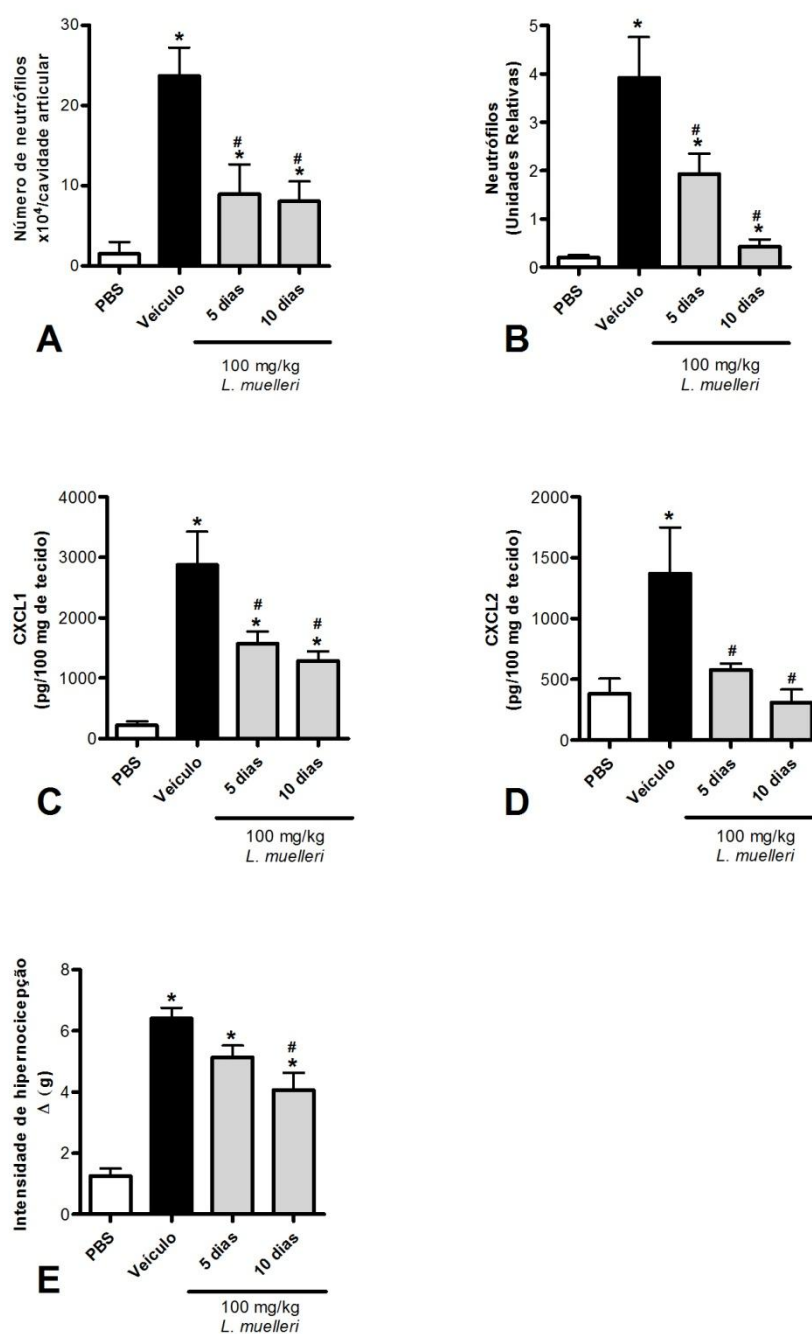


Figura 4.27 – Efeito induzido pelo granulado de *L. muelleri* (100 mg/kg) sobre o número de neutrófilos na cavidade articular (A) e tecido periarticular (B), concentração de CXCL1 (C) e CXCL2 (D) e hipernociceção mecânica (E) em modelo de AIA. Foram avaliados cinco e dez dias de tratamento. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=7$ animais por grupo). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (PBS); # $p<0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

Em seguida, o granulado de *L. muelleri* foi avaliado nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg em um tratamento por 10 dias anteriormente ao desafio. Observou-se, em relação ao grupo de animais artríticos (animais tratados com veículo), redução da

migração de neutrófilos para os tecidos periarticulares (**Figura 4.28 B**) em todas as doses ensaiadas, enquanto a migração de neutrófilos para a cavidade articular (**Figura 4.28 A**) foi reduzida apenas com as doses de 30 e 100 mg/kg. As três doses avaliadas promoveram diminuição dos níveis de CXCL2 (**Figura 4.28 D**) nos tecidos periarticulares, enquanto apenas a dose mais elevada ocasionou redução estatisticamente significativa na concentração de CXCL1 (**Figura 4.28 C**) e na hipernocicepção mecânica (**Figura 4.28 E**). Desse modo, os demais experimentos foram conduzidos utilizando o granulado de *L. muelleri* na dose de 100 mg/kg, durante dez dias de tratamento.

Devido ao elevado conteúdo de carbonato de cálcio presente no granulado de *L. muelleri*, os experimentos seguintes foram conduzidos para avaliar, de forma comparativa, o efeito do tratamento dos animais com a alga e com carbonato de cálcio isoladamente. Em todos os parâmetros avaliados, o carbonato de cálcio não ocasionou qualquer alteração significativa em relação ao grupo dos animais artríticos (**Figura 4.29**). Já para o grupo tratado com *L. muelleri* observou-se redução na migração de neutrófilos (**Figuras 4.29 A e B**) e na hipernocicepção mecânica (**Figura 4.29 D**). Além disso, o tratamento com a alga exerceu um efeito protetor sobre a articulação, preservando o conteúdo de proteoglicanos (**Figura 4.29 C**). As pranchas histológicas permitem visualizar esses efeitos de forma clara, mostrando significativa redução do infiltrado inflamatório (**Figura 4.30**) e a manutenção do conteúdo de proteoglicanos (**Figura 4.31**) somente para o grupo tratado com o granulado da alga. Considerando todos esses parâmetros, o índice de artrite para o grupo de animais tratado com *L. muelleri* é inferior ao dos animais não tratados ou tratados com o carbonato de cálcio isoladamente (**Figura 4.29 E**). Os dados obtidos permitem concluir, portanto, que isoladamente o carbonato de cálcio presente em *L. muelleri* não explica a atividade antiartrítica da espécie. Por conseguinte, outro constituinte deve ser responsável pela atividade biológica observada, seja isoladamente ou em sinergismo com os demais componentes minerais da alga.

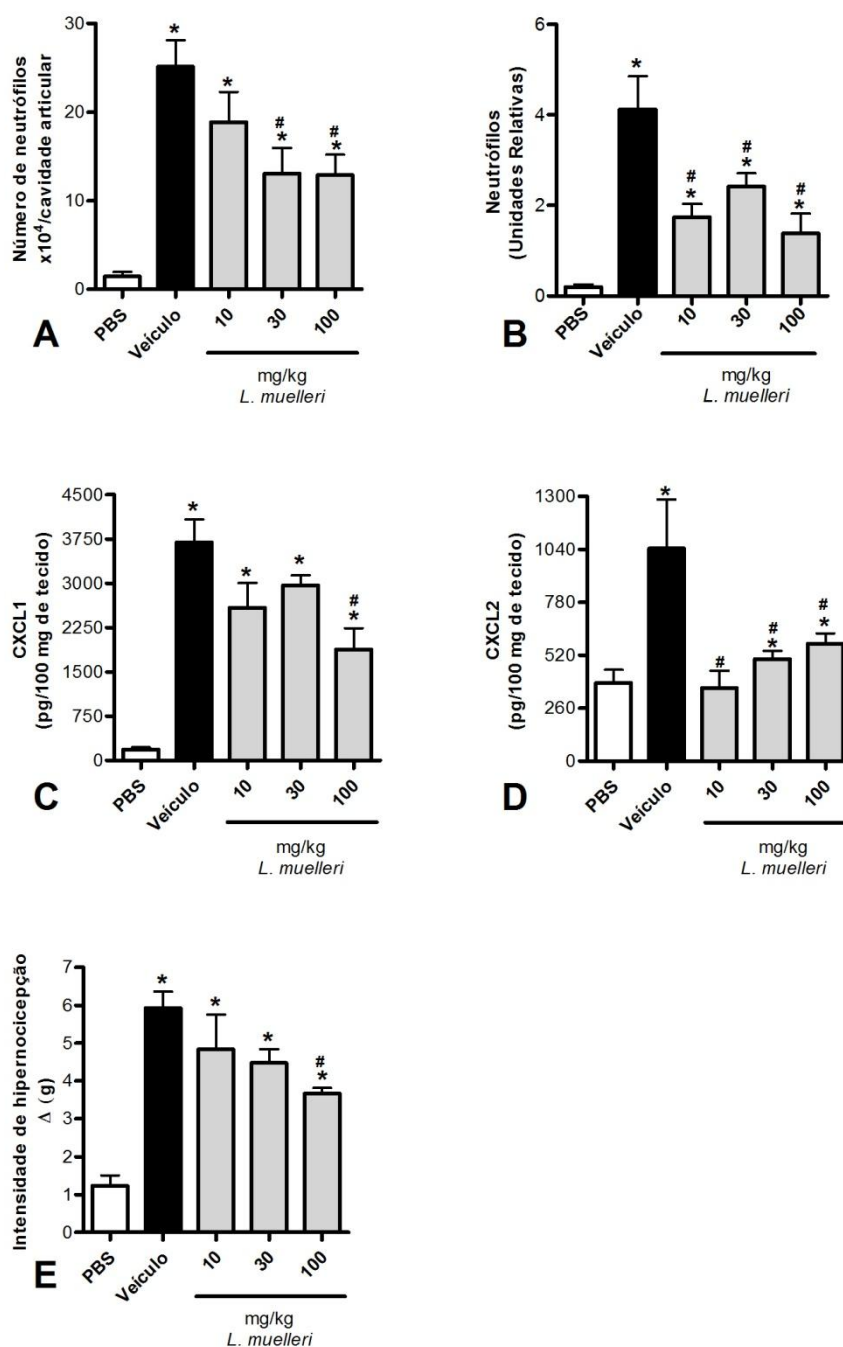


Figura 4.28 – Efeito induzido pelo granulado de *L. muelleri* (10 dias de tratamento) sobre o número de neutrófilos na cavidade articular (A) e no tecido periarticular (B), concentração de CXCL1 (C) e CXCL2 (D) e hipernociceção mecânica (E) em modelo de AIA. Foram avaliadas as doses de 10, 30 e 100 mg/kg. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=7$ animais por grupo). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (PBS); # $p<0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

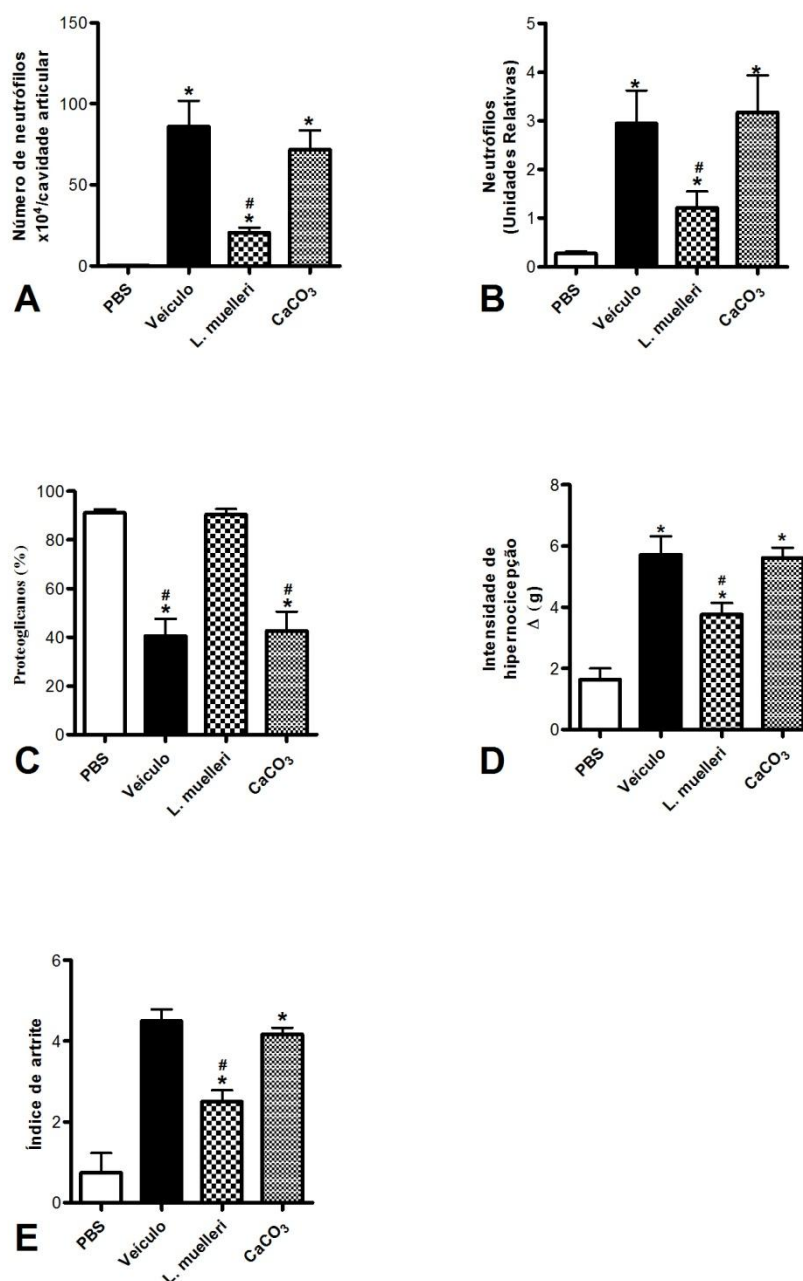


Figura 4.29 – Efeito induzido pelo granulado de *L. muelleri* (100 mg/kg) e carbonato de cálcio (100 mg/kg), sobre o número de neutrófilos na cavidade articular (A) e no tecido periarticular (B), conteúdo de proteoglicanos (C) e hipernociceção mecânica (D) em modelo de AIA. Também é apresentado o índice de artrite (E), determinado histologicamente. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=7$ animais por grupo). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (PBS); # $p<0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

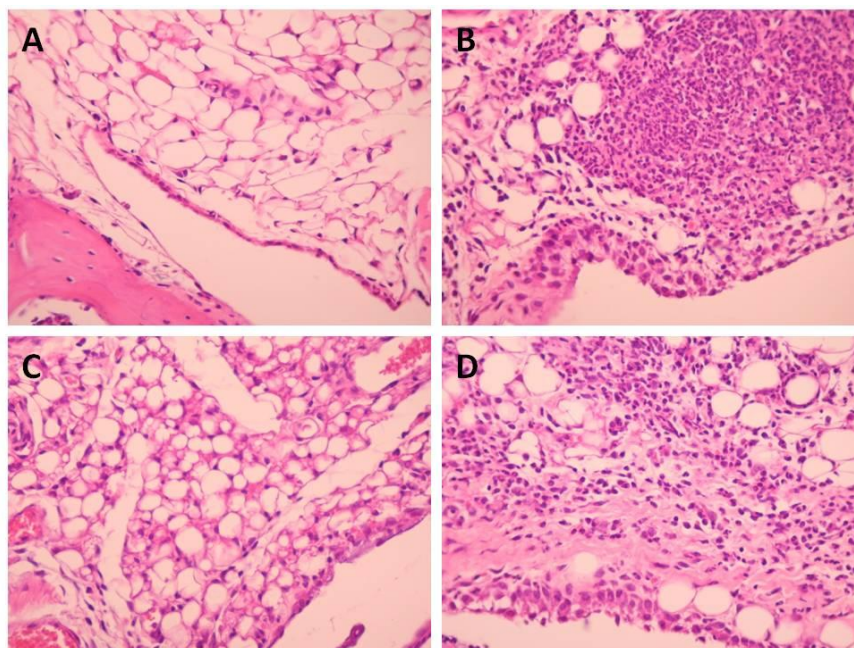


Figura 4.30 – Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados e desafiados com PBS (A) ou mBSA (B, C, D). As seções das articulações do joelho foram coradas com hematoxilina e eosina e evidenciam o aumento do infiltrado inflamatório no tecido periarticular dos animais artríticos (B) ou tratados com CaCO_3 (D), em relação ao grupo controle (A) e aos animais tratados com *L. muelleri* (C). Aumento de 40x.

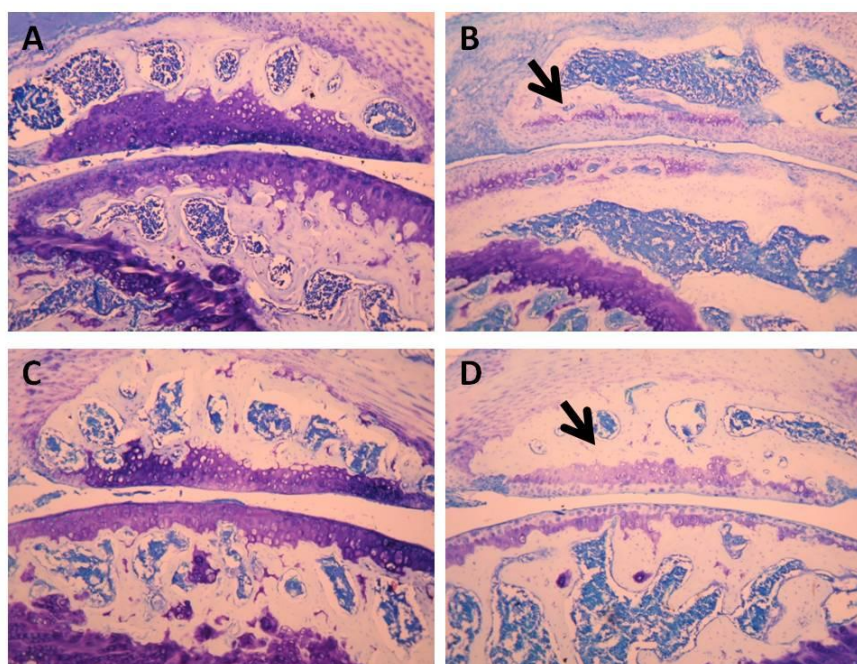


Figura 4.31 – Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados e desafiados com PBS (A) ou mBSA (B, C, D). As seções das articulações do joelho foram coradas com azul de toluidina e evidenciam a perda de proteoglicanos na cartilagem dos animais artríticos (B) ou tratados com CaCO_3 (D), em relação ao grupo controle (A) e aos animais tratados com *L. muelleri* (C). Aumento de 40x.

As interações entre leucócitos e endotélio vascular foram avaliadas na articulação dos camundongos em estudo. Os dados da **Figura 4.32** indicam um aumento do

rolamento e da adesão leucocitária nos animais artríticos (tratados com veículo) em relação ao grupo controle (PBS). O mesmo perfil é observado para os animais tratados com CaCO_3 isoladamente. Já o grupo tratado com o granulado de *L. muelleri* apresenta uma redução estatisticamente significativa na adesão de leucócitos em relação aos animais artríticos. Assim, a adesão parece ser a etapa da migração celular mais afetada pelo tratamento com *L. muelleri*.

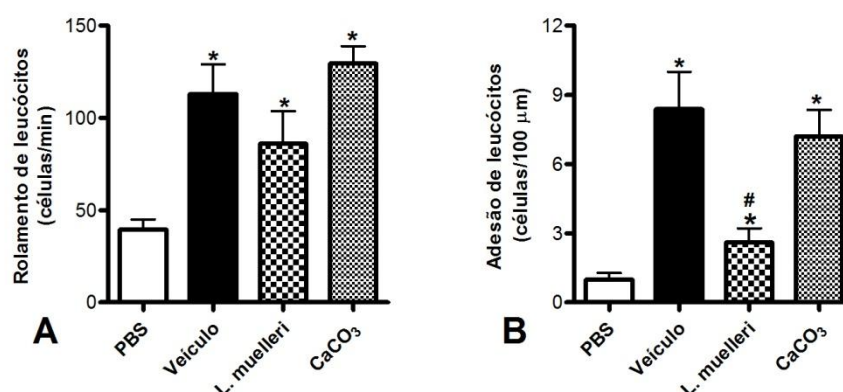


Figura 4.32 – Efeito induzido pelo granulado de *L. muelleri* (100 mg/kg) e CaCO_3 (100 mg/kg), no rolamento (A) e adesão (B) dos leucócitos no endotélio da microvasculatura sinovial. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=7$ animais por grupo). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (PBS); # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

A partir dos resultados anteriores, que demonstraram que o carbonato de cálcio presente em *L. muelleri* não é o constituinte responsável, isoladamente, pela atividade biológica demonstrada, partiu-se para a investigação das frações enriquecidas em polissacarídeos obtidas no presente estudo. As frações B1 e B2 foram avaliadas na dose de 1 mg/kg, juntamente com o granulado de *L. muelleri* (100 mg/kg). Os experimentos foram conduzidos de maneira semelhante àqueles para investigação da atividade do CaCO_3 . Em todos os parâmetros avaliados, B1 e B2 tiveram comportamento similar ao granulado da alga, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (**Figura 4.33**). O tratamento com a alga, B1 e B2 promoveu redução significativa da migração de neutrófilos (**Figuras 4.33 A e B**) e hipernocicepção mecânica (**Figura 4.33 D**) em relação aos animais artríticos. Além disso, os três grupos preservaram o conteúdo de proteoglicanos na cartilagem da articulação (**Figura 4.33 C**).

Procedeu-se a análise histopatológica para visualizar os efeitos sobre a migração celular e a perda de proteoglicanos na cartilagem. A **Figura 4.34** indica que o infiltrado inflamatório é menor nos grupos tratados com a alga, B1 e B2, em relação aos animais artríticos não tratados. A preservação dos proteoglicanos na cartilagem também é evidenciada para os grupos tratados com o granulado e com as frações enriquecidas em polissacarídeos (**Figura 4.35**). O menor índice de artrite para os três grupos de animais tratados em relação aos animais não tratados (**Figura 4.33 E**) confirma a eficácia das amostras no modelo de AIA.

Com relação ao efeito das frações B1 e B2 sobre a migração celular, observa-se comportamento semelhante ao tratamento com a alga (**Figura 4.36**). Há uma redução estatisticamente significativa na adesão de leucócitos, o que indica ser este o mecanismo pelo qual as frações induzem a redução no exsudato inflamatório.

Os resultados obtidos indicam que polissacarídeos sulfatados presentes nas frações B1 e B2 são responsáveis pela atividade antiartrítica da alga *L. muelleri*.

Os neutrófilos são células relacionadas ao desencadeamento e à progressão da artrite reumatóide (WIPKE & ALLEN, 2001; COELHO *et al.*, 2008; BARSANTE *et al.*, 2008; SACHS *et al.*, 2011). A melhora dos parâmetros associados à artrite reumatóide no modelo de AIA, evidenciada pela redução do índice de artrite e redução da hipernocicepção, tem relação direta com a redução do influxo de neutrófilos para a cavidade articular e tecido periarticular. Esses efeitos foram demonstrados para os grupos tratados com *L. muelleri* e com as frações B1 e B2. Cabe ressaltar que os experimentos mostraram que o granulado de *L. muelleri* foi capaz de reduzir as concentrações de CXCL1 e CXCL2, duas das quimiocinas mais importantes no recrutamento de neutrófilos (COELHO *et al.*, 2008), podendo ser este um dos principais mecanismos para a atividade biológica de *L. muelleri*.

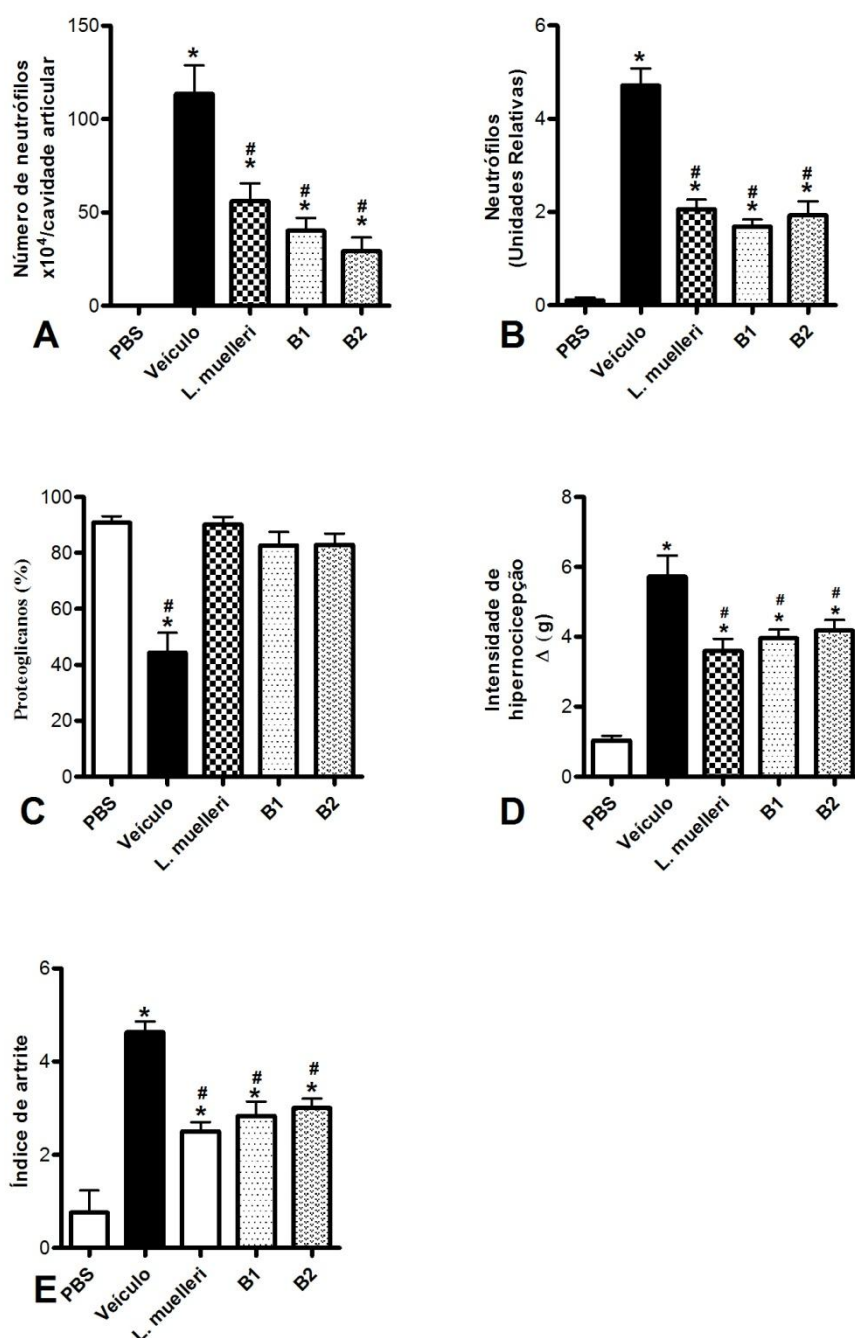


Figura 4.33 – Efeito induzido pelo granulado de *L. muelleri* (100 mg/kg) e as frações enriquecidas em polissacarídeos B1 (1 mg/kg) e B2 (1 mg/kg) sobre o número de neutrófilos na cavidade articular (A) e no tecido periarticular (B), conteúdo de proteoglicanos (C) e hipernociceção mecânica (D) em modelo de AIA. Também é apresentado o índice de artrite (E), determinado histologicamente. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=7$ animais por grupo). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (PBS); # $p<0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

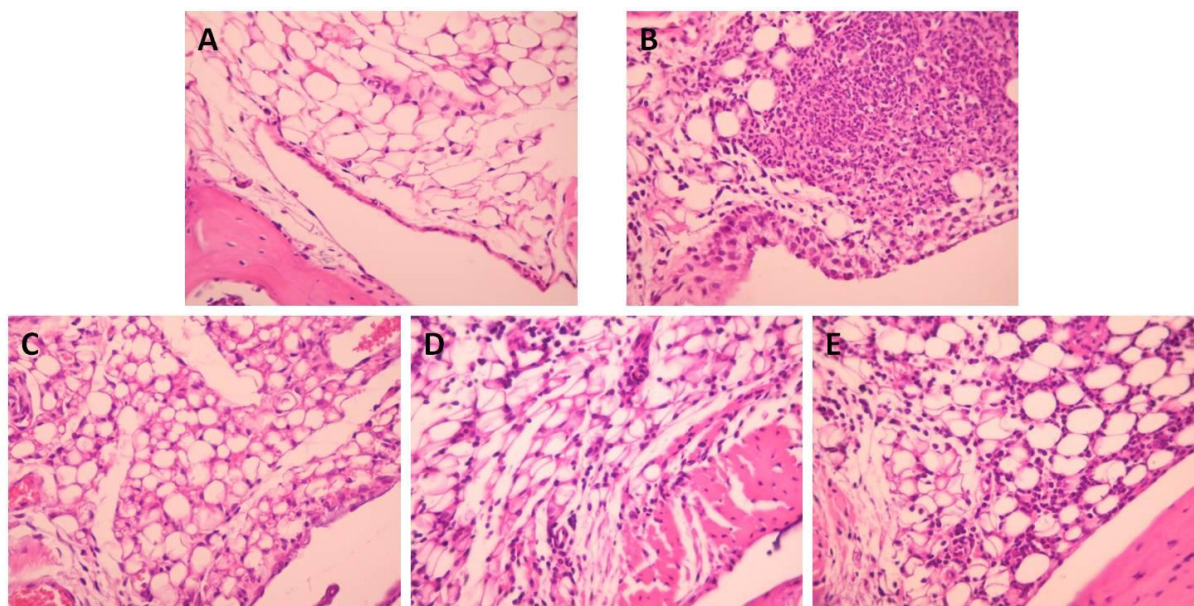


Figura 4.34 – Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados e desafiados com PBS (A) ou mBSA (B, C, D, E). As seções das articulações do joelho foram coradas com hematoxilina e eosina, evidenciando o aumento do infiltrado inflamatório no tecido periarticular dos animais artríticos (B) em relação aos grupos tratados com *L. muelleri* (C), B1 (D) e B2 (E). Aumento de 40x.

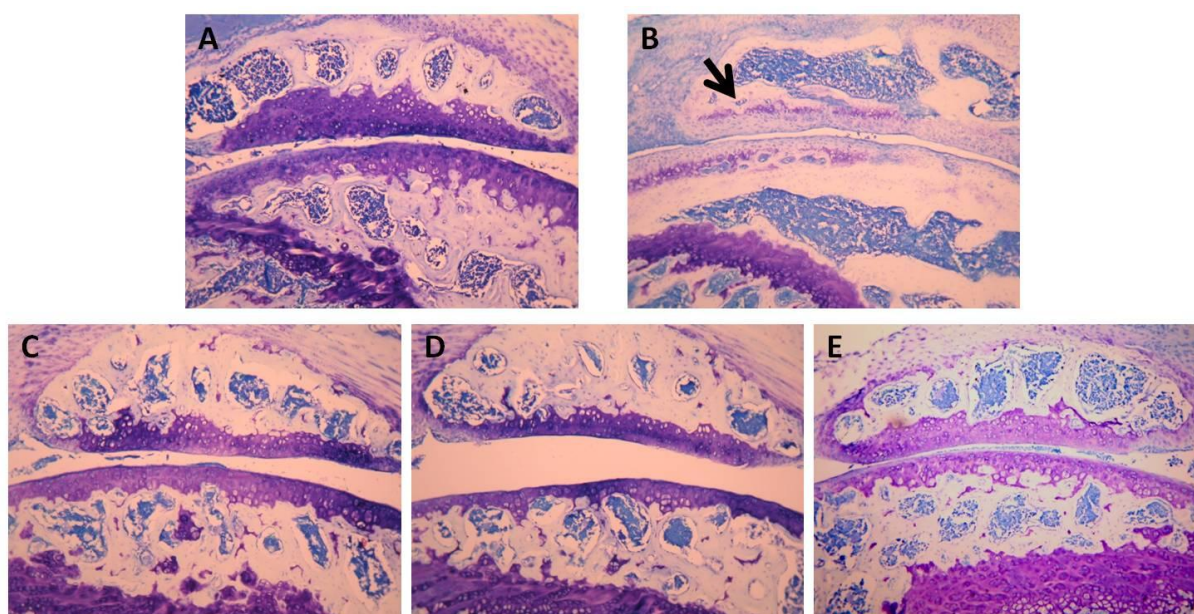


Figura 4.35 – Análise histopatológica da articulação fêmur-tibial de camundongos imunizados e desafiados com PBS (A) ou mBSA (B, C, D, E). As seções das articulações do joelho foram coradas com azul de toluidina e evidenciam a perda de proteoglicanos na cartilagem dos animais artríticos (B) em relação aos grupos tratados com *L. muelleri* (C), B1 (D) e B2 (E). Aumento de 40x.

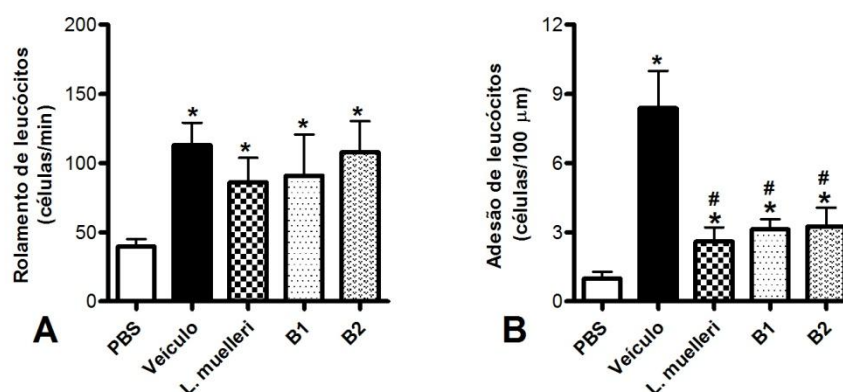


Figura 4.36 – Efeito induzido pelo granulado de *L. muelleri* (100 mg/kg) e pelas frações enriquecidas em polissacarídeos B1 (1 mg/kg) e B2 (1 mg/kg) no rolamento (A) e adesão (B) dos leucócitos no endotélio da microvasculatura sinovial. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=7$ animais por grupo). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle (PBS); # $p<0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA com pós-teste de Student-Newman-Keuls).

4.8 Papel dos polissacarídeos na atividade antiartrítica de *L. muelleri*

O granulado de *L. muelleri* apresentou pronunciada atividade antiartrítica em modelo de AIA, na dose de 100 mg/kg, com 10 dias de tratamento (administração por gavagem de 12/12 h). A redução da migração de neutrófilos, possivelmente relacionada à redução dos níveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL2, proporcionou melhora significativa dos parâmetros associados à patologia (exsudato inflamatório, hipernocicepção, degradação dos proteoglicanos da cartilagem).

Tendo em vista que o carbonato de cálcio é o componente majoritário do granulado de *L. muelleri*, avaliou-se inicialmente a atividade antiartrítica deste constituinte. Os resultados obtidos não indicaram qualquer benefício associado ao tratamento com carbonato de cálcio isoladamente. Logo, a atividade biológica da alga está associada a outro(s) constituinte(s).

Considerando o crescente número de atividades biológicas demonstradas para polissacarídeos de produtos marinhos, dentre as quais se destacam aquelas relacionadas à atividade antiinflamatória (TANGELDER & ARFORS, 1991;

BERTEAU & MULLOY, 2003; FRITZSCHE *et al.*, 2006; CUMASHI *et al.*, 2007; GROTH *et al.*, 2009), as frações B1 e B2 foram submetidas à avaliação biológica. A dose utilizada foi de 1 mg/kg, durante 10 dias de tratamento, no mesmo esquema utilizado para o granulado. Todos os parâmetros avaliados demonstraram a atividade antiartrítica dos polissacarídeos sulfatados de *L. muelleri*, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com as frações (1 mg/kg) ou com a alga (100 mg/kg). Assim, uma dose cem vezes menor das frações enriquecidas em polissacarídeos apresentou o mesmo efeito que o granulado da alga. Esses resultados possibilitam correlacionar a atividade antiartrítica da espécie com seus polissacarídeos sulfatados.

A primeira vista pode-se inferir que as frações ricas em polissacarídeos têm maior atividade que o granulado da alga, já que uma dose cem vezes menor de B1 e B2 induziu a mesma resposta biológica que o material de partida. Porém, deve-se considerar que a concentração de polissacarídeos no granulado de *L. muelleri* segue a proporção de 1:1.000, já que o rendimento médio das frações enriquecidas em polissacarídeos foi de 0,12%. Assim, na realidade, é o granulado da alga que apresenta melhor atividade biológica.

Uma possível explicação para essa constatação é a existência de outro(s) constituinte(s) ativo(s) no granulado de *L. muelleri*, o que potencializaria a ação dos polissacarídeos sulfatados. Esse aparente sinergismo pode ter uma relação direta com o carbonato de cálcio, componente majoritário da espécie. Outra possibilidade é a associação de elementos minerais às cadeias polissacarídicas na forma de contra-íons com os grupos sulfato ou açúcares ácidos. Essa associação poderia alterar a digestão dos polissacarídeos ou até mesmo a flora intestinal, potencializando a atividade antiartrítica da espécie.

A inibição da migração celular induzida por *L. muelleri* e seus polissacarídeos sulfatados parece ocorrer devido ao bloqueio da adesão dos leucócitos ao endotélio vascular. Não houve uma inibição estatisticamente significativa do rolamento de leucócitos. Estudos anteriores com fucanas sulfatadas mostraram atividade inibitória do rolamento de leucócitos dependente de selectinas para várias espécies de algas pardas (TANGELDER & ARFORS, 1991; BERTEAU & MULLOY, 2003; FRITZSCHE

et al., 2006; CUMASHI *et al.*, 2007). A ausência de atividade de *L. muelleri* nessa etapa da migração celular deve estar relacionada às diferenças estruturais entre fucanas e galactanas. A importância do processo de migração celular na fisiopatologia de doenças inflamatórias crônicas (como a artrite reumatóide) ressalta o potencial terapêutico de polissacarídeos com atividade inibitória do rolamento e/ou adesão celular nessas patologias.

Outra característica relevante da atividade antiartrítica demonstrada para *L. muelleri* é a proteção dos proteoglicanos da cartilagem. Este efeito é extremamente importante para a manutenção da função das articulações artríticas, impedindo a degradação acelerada das cartilagens. A degradação é associada a uma série de enzimas, dentre as quais se destacam metaloproteinases (FIRESTEIN, 2010). A ação de *L. muelleri* e seus polissacarídeos sulfatados sobre a redução da perda de proteoglicanos pode estar diretamente associada à redução dessas enzimas. Uma das formas de se inibir a síntese de metaloproteinases é a inibição de citocinas (como IL-1 e TNF- α) que induzem os genes responsáveis por suas sínteses.

Ainda são poucos os estudos da atividade antiartrítica de polissacarídeos. Porém, a carência de opções terapêuticas, os altos custos e a ampla gama de efeitos adversos dos tratamentos disponíveis para o controle dessa patologia justificam a busca de novos agentes. O crescente número de polissacarídeos com atividade antiinflamatória, associado à ausência de toxicidade de compostos desta classe, deve encorajar sua avaliação em modelos experimentais de artrite. Ho *et al.* (2007) avaliaram o efeito de um polissacarídeo peptídico isolado do cogumelo *Ganoderma lucidum* (usado na medicina tradicional chinesa) na inibição da liberação de citocinas e proliferação de fibroblastos em modelos *in vitro*. O polissacarídeo em questão apresenta glicose, xilose e fucose como os principais açúcares constituintes, com massa molecular média de 513 kDa. A porção peptídica deve-se à presença de 16 tipos de aminoácidos. Os autores observaram a redução da proliferação de fibroblastos sinoviais de pacientes artríticos e da liberação de IL-8 e MCP-1. Os efeitos encontrados foram atribuídos, pelo menos em parte, à inibição da via de transcrição de NF- κ B (HO *et al.*, 2007).

A promissora atividade antiartrítica de *L. muelleri* é relatada pela primeira vez neste trabalho. Os polissacarídeos sulfatados da espécie possuem correlação direta com a atividade biológica demonstrada. Porém, estudos adicionais são necessários para identificar as características estruturais de polissacarídeos sulfatados requeridas para a atividade antiartrítica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os polissacarídeos estão entre os principais constituintes químicos de algas vermelhas, sendo galactanas sulfatadas os compostos característicos deste grupo. As propriedades gelificantes apresentadas por muitos desses polímeros possuem aplicação industrial. Porém, dentre as Rhodophytas, ainda há poucas pesquisas sobre a constituição polissacarídica das algas calcárias. Além das dificuldades de se trabalhar com espécies de algas calcárias, o baixo rendimento de polissacarídeos desencoraja alguns pesquisadores.

No presente trabalho, frações enriquecidas em polissacarídeos (B1 e B2) foram obtidas da espécie *Lithothamnion muelleri*, uma alga vermelha calcária de ocorrência no litoral brasileiro. O processo de extração e obtenção das frações foi otimizado visando sua simplificação e melhor rendimento global. O rendimento médio das frações em relação ao material de partida foi de 0,12%. A análise da constituição mineral da espécie mostrou um elevado conteúdo de cálcio e magnésio.

As frações B1 e B2 foram submetidas à cromatografia de filtração molecular originando, respectivamente, Fra B1 e Fra B2. Essas duas sub-frações contêm o polissacarídeo majoritário das frações enriquecidas.

Procedeu-se à caracterização estrutural de B1, B2, Fra B1 e Fra B2 utilizando métodos químicos e espectroscópicos. A composição de todas as frações mostrou-se bastante próxima, sendo sua natureza polissacarídica confirmada por diferentes abordagens. Análises por cromatografia gasosa dos hidrolisados de B1 e B2, após derivatização, indicaram que o polissacarídeo majoritário constituinte de *L. muelleri* é uma xilogalactana, sendo também detectados teores significativos de glicose e manose, prováveis substituintes da xilogalactana. A caracterização estrutural realizada também indicou que o polissacarídeo em questão é sulfatado e apresenta açúcares ácidos em sua composição.

A atividade biológica do granulado de *L. muelleri* e das frações enriquecidas em polissacarídeos B1 e B2 foi avaliada *in vivo*, em modelo de artrite induzida por

antígeno. Tanto a alga como as frações B1 e B2 reduziram significativamente o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular e tecido periarticular, a hipernocicepção mecânica relacionada à inflamação e o índice de artrite (determinado histologicamente). Os tratamentos mostraram-se efetivos na redução dos sinais associados à patologia e na prevenção de danos decorrentes da doença (como a degradação de proteoglicanos na articulação). Assim, os resultados positivos apresentados pelas frações enriquecidas atestaram a importância dos polissacarídeos para a atividade biológica do granulado de *L. muelleri*. Os animais artríticos tratados com carbonato de cálcio não apresentaram melhora nos parâmetros avaliados, indicando que, isoladamente, este constituinte mineral não responde pela atividade da espécie. Estudos adicionais devem ser realizados para determinar os mecanismos de ação dos componentes ativos de *L. muelleri*.

Em suma, os resultados obtidos no presente trabalho possibilitaram avançar no conhecimento sobre a estrutura química do polissacarídeo constituinte de *L. muelleri*, bem como demonstrar sua atividade em modelo experimental de artrite.

6 CONCLUSÕES

- O granulado da alga vermelha *Lithothamnion muelleri* apresentou uma composição mineral rica em cálcio e magnésio, condizente com a natureza calcária da espécie.
- O processo de obtenção de frações enriquecidas em polissacarídeos a partir de *L. muelleri* foi otimizado, resultando em rendimento médio de 0,12%.
- As frações enriquecidas e as sub-frações obtidas a partir de cromatografia de filtração molecular foram submetidas à caracterização estrutural por métodos químicos, cromatográficos e espectroscópicos, confirmando sua natureza polissacarídica e similaridade na composição química.
- O polissacarídeo majoritário da espécie *L. muelleri* é uma xilogalactana sulfatada, que também apresenta elevados teores de glicose e manose, segundo análises por GC-FID.
- As frações enriquecidas em polissacarídeos e o granulado de *L. muelleri* apresentaram atividade em modelo experimental de artrite em camundongo, reduzindo o recrutamento de neutrófilos para a cavidade articular e/ou tecido periarticular, a hipernocicepção mecânica relacionada à inflamação, bem como o índice de artrite determinado histologicamente.
- A ausência de atividade do carbonato de cálcio no modelo experimental de artrite indica que, isoladamente, este constituinte mineral não responde pela atividade da espécie, que está diretamente relacionada à sua composição polissacarídica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, K. P.; BECKER, H. *Pharmazeutische biologie: analytik biogener arzneistoffe*. Stuttgart: Wissenschaftliche, 2000. 492 p.
- AMADO-FILHO, G. M. *et al.* Seaweed diversity associated with a Brazilian tropical rhodolith bed. *Ciencias Marinas*, v. 36, n. 4, p. 371-391, 2010.
- AMANCIO, C. E. *Precipitação de CaCO₃ em algas marinhas calcárias e balanço de CO₂ atmosférico: os depósitos calcários marinhos podem atuar como reservas planetárias de carbono?* 2007. 64 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ANDREAKOS, E. T. *et al.* Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 13, n. 4-5, p. 299-313, 2002.
- ASLAM, M. N. *et al.* Growth-inhibitory effects of a mineralized extract from the red marine algae, *Lithothamnion calcareum*, on Ca²⁺-sensitive and Ca²⁺-resistant human colon carcinoma cells. *Cancer Letters*, v. 283, n. 2, p. 186-192, 2009.
- ASLAM, M. N. *et al.* A mineral-rich extract from the red marine algae *Lithothamnion calcareum* preserves bone structure and function in female mice on a western-style diet. *Calcified Tissue International*, v. 86, n. 4, p. 313-324, 2010.
- ASLAM, M. N. *et al.* A mineral-rich red algae extract inhibits polyp formation and inflammation in the gastrointestinal tract of mice on a high-fat diet. *Integrative Cancer Therapies*, v. 9, n. 1, p. 93-99, 2010.
- BARCELOS, L. S. *et al.* Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 78, n. 2, p. 352-358, 2005.
- BARSANTE, M. M. *et al.* Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *British Journal of Pharmacology*, v. 153, n. 5, p. 992-1002, 2008.
- 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, n. 6, p. 29R-40R, 2003.

BÉRTOLO, M. B. *et al.* Consenso brasileiro de doenças reumáticas: atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. *Temas de Reumatologia Clínica*, v. 10, n. 1, p. 6-14, 2009.

BILAN, M. I.; USOV, A. I. Polysaccharides of calcareous algae and their effect on the calcification process. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 27, n. 1, p. 2-16, 2001.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for the quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, v. 54, p. 484-489, 1973.

BLUNDEN, G. *et al.* Chemical and physical characterization of calcified red algal deposits known as maerl. *Journal of Applied Phycology*, v. 9, n. 1, p. 11-17, 1997.

BLUNT, J. W. *et al.* Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 23, n. 1, p. 26-78, 2006.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. *Portaria SAS/MS nº 865*, 5 nov. 2002. Brasília: 2002.

CHIAL, H. J.; THOMPSON, H. B.; SPLITTGERBER, A. G. A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue-G. *Analytical Biochemistry*, v. 209, n. 2, p. 258-266, 1993.

CHOPIN, T.; KERIN, B. F.; MAZEROLLE, R. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the gigartinales, Rhodophyceae: a review and current developments using fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research*, v. 47, n. 3, p. 167-188, 1999.

COELHO, F. M. *Efeito do antagonista do receptor CXCR2, repertaxina, na resposta inflamatória em modelo experimental de artrite*. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

COELHO, F. M. *et al.* The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and Rheumatism*, v. 58, n. 8, p. 2329-2337, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* Marine organisms as a source of new pharmaceuticals: history and perspectives. *Quimica Nova*, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

COSTA, L. S. *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 64, n. 1, p. 21-28, 2010.

CUI, S. W. *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. 418 p.

CUMASHI, A. *et al.* A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, v. 17, n. 5, p. 541-552, 2007.

DAME, M. K. *et al.* Human colon tissue in organ culture: calcium and multi-mineral-induced mucosal differentiation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 47, n. 1, p. 32-38, 2011.

DEWICK, P. M. Carbohydrates. In: DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3 ed. Chichester: Wiley, 2009. cap. 8, p. 485-508.

DIAS, G. T. M. Granulados bioclásticos: algas calcárias. *Brazilian Journal of Geophysics*, v. 18, n. 3, p. 307-318, 2000.

DISCHE, Z. New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. *Methods of Biochemical Analysis*, v. 2, p. 313-358, 1955.

DO, S. H. *et al.* ENA actimineral resource a restores bone loss and bone quality in ovariectomized rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 295, n. 1-2, p. 35-43, 2007.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochemical Journal*, v. 78, n. 2, p. 312-319, 1961.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on determination of ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*, v. 84, n. 1, p. 106-110, 1962.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FARIAS, W. R. L. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans - Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FERRAZ, V. P. *Métodos cromatográficos para a análise de aminoácidos e açúcares em sementes de Canavalia gladiata*. 1991. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.

FERREIRA, L. G. *et al.* Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, v. 347, n. 1, p. 83-94, 2012.

FILISSETTI-COZZI, T.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic-acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, v. 197, n. 1, p. 157-162, 1991.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 356-361, 2003.

FIRESTEIN, G. S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology*, v. 11, n. 3, p. S39-S44, 2005.

FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 15, n. 2, p. 1-24, 2010.

FOSTER, M. S. Rhodoliths: between rocks and soft places. *Journal of Phycology*, v. 37, n. 5, p. 659-667, 2001.

FOSTER, M. S. *et al.* Diversity and natural history of a *Lithothamnion muelleri* Sargassum horridum community in the gulf of California. *Ciencias Marinas*, v. 33, n. 4, p. 367-384, 2007.

FRESTEDT, J. L.; KUSKOWSKI, M. A.; ZENK, J. L. A natural seaweed derived mineral supplement (Aquamin F) for knee osteoarthritis: a randomised, placebo controlled pilot study. *Nutrition Journal*, v. 8, 2009.

FRESTEDT, J. L. *et al.* A natural mineral supplement provides relief from knee osteoarthritis symptoms: a randomized controlled pilot trial. *Nutrition Journal*, v. 7, 2008.

FRITZSCHE, J. *et al.* The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity. *Biochemical Pharmacology*, v. 72, n. 4, p. 474-485, 2006.

GLASER, K. B.; MAYER, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical Pharmacology*, v. 78, n. 5, p. 440-448, 2009.

GREGORY, J. D. The effect of borate on the carbazole reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 89, n. 2, p. 157-159, 1960.

GROTH, I.; GRUNEWALD, N.; ALBAN, S. Pharmacological profiles of animal- and nonanimal-derived sulfated polysaccharides - comparison of unfractionated heparin, the semisynthetic glucan sulfate PS3, and the sulfated polysaccharide fraction isolated from *Delesseria sanguinea*. *Glycobiology*, v. 19, n. 4, p. 408-417, 2009.

GUERRERO, A. T. G. *et al.* Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 84, n. 2, p. 244-251, 2006.

GUERRIERO, A.; DAMBROSIO, 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, n. 8, p. 2183-2189, 1990.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. *AlgaeBase*. World-wide eletronic publication. Galway: National University of Ireland, 1996. Disponível em: < <http://www.algaebase.com> >. Acesso em: 22 mar. 2010.

HARVEY, A. S.; WOELKERLING, W. J. A guide to nongeniculate coralline red algal (Corallinales, Rhodophyta) rhodolith identification. *Ciencias Marinas*, v. 33, n. 4, p. 411-426, 2007.

HENRIQUES, M. C. *et al.* New records of rhodolith-forming species (Corallinales, Rhodophyta) from deep water in Espírito Santo State, Brazil. *Helgoland Marine Research*, p. não paginado, 2011.

HO, Y. W. *et al.* Ganoderma lucidum polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 301, n. 1-2, p. 173-179, 2007.

HONG, I.-H. *et al.* The protective effect of ENA actimineral resource A on CCL(4)-induced liver injury in rats. *Marine Biotechnology*, v. 13, n. 3, p. 462-473, 2011.

JIAO, G. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

JORK, H. *et al.* *Thin-layer chromatography: reagents and detection methods*. Weinheira: 1990. 496 p.

KANNAN, K.; ORTMANN, R. A.; KIMPEL, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*, v. 12, n. 3, p. 167-181, 2005.

KASAMA, T. *et al.* Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, v. 4, n. 3, p. 273-279, 2005.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. In: WALKER, J. M. *The protein protocols handbook*. 2 ed. Totowa: Humana Press, 1996. cap. 4, p. 15-21.

KWOH, C. K. *et al.* Guidelines for the management of rheumatoid arthritis - 2002 update. *Arthritis and Rheumatism*, v. 46, n. 2, p. 328-346, 2002.

LEE, Y.; KANG, S. *A catalogue of the seaweeds in Korea*. Jeju: 2001. 662 p. *apud* AMADO-FILHO, G. M. *et al.* Seaweed diversity associated with a Brazilian tropical rhodolith bed. *Ciencias Marinas*, v. 36, n. 4, p. 371-391, 2010.

LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, p. 678-689, 2007.

LIPSKI, P. E. Rheumatoid arthritis. In: HARRISSON, T. S. *et al. Harisson's Principles of Internal Medicine*. 14 ed. New York: McGraw Hill, 1998. p. 1928-1934.

LUND, M.; DAVIES, P. J.; BRAGA, J. C. Coralline algal nodules off Fraser Island, eastern Australia. *Facies*, v. 42, p. 25-34, 2000.

MAO, W. *et al.* Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied Phycology*, v. 18, n. 1, p. 9-14, 2006.

MAO, W. J. *et al.* Preliminary studies on the chemical characterization and antihyperlipidemic activity of polysaccharide from the brown alga *Sargassum fusiforme*. *Hydrobiologia*, v. 512, n. 1-3, p. 263-266, 2004.

MARINHO-SORIANO, E. *et al.* Frontiers on algae bioactive compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, n. 2, p. não paginado, 2011.

MASUKO, T. *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, v. 339, n. 1, p. 69-72, 2005.

MATSUI, M. S. *et al.* Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 104, n. 1, p. 13-22, 2003.

MAYER, A. M. *et al.* The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 31, n. 6, p. 255-265, 2010.

MAYER, A. M. S. *et al.* Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1790, n. 5, p. 283-308, 2009.

MCDONALD, B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, v. 330, p. 362-366, 2010.

MELLINGER, C. G. *Caracterização estrutural e atividade biológica de carboidratos de Phyllanthus niruri (quebra-pedras)*. 2006. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MELLINGER, C. G. *et al.* Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, n. 2, p. 115-120, 2008.

NASTRUCCI, C.; RUSSO, P. Anticancer drug discovery from the marine environment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, p. não paginado, 2012.

NAVARRO, D. A. *et al.* Xylogalactans from *Lithothamnion heterocladum*, a crustose member of the Corallinales (Rhodophyta). *Carbohydrate Polymers*, v. 84, n. 3, p. 944-951, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

PHILLIPSON, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, p. 2569-2705, 2006.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, v. 17, p. 1381-1390, 2011.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002.

POHLERS, D. *et al.* Anti-CD4 monoclonal antibody treatment in acute and early chronic antigen-induced arthritis: influence on T helper cell activation. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 135, n. 3, p. 409-415, 2004.

POMIN, V. H. Review: an overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. *Biopolymers*, v. 93, n. 5, p. 496-496, 2010.

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

QUEIROZ-JUNIOR, C. M. *et al.* Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF-alpha and the oral microbiota. *Journal of Immunology*, v. 187, n. 7, p. 3821-3830, 2011.

RAMÍREZ, M. E.; SANTELICES, B. Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. *Monografías Biológicas*, n. 5, p. 1-437, 1991 *apud* AMADO-FILHO, G. M. *et al.* Seaweed diversity associated with a Brazilian tropical rhodolith bed. *Ciencias Marinas*, v. 36, n. 4, p. 371-391, 2010.

RAO, P.; PATTABIRAMAN, T. N. Reevaluation of the phenol sulfuric-acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Analytical Biochemistry*, v. 181, n. 1, p. 18-22, 1989.

RIVERA, M. G.; RIOSMENA-RODRIGUEZ, R.; FOSTER, M. S. Age and growth of *Lithothamnion muelleri* (Corallinales, Rhodophyta) in the southwestern Gulf of California, Mexico. *Ciencias Marinas*, v. 30, n. 1B, p. 235-249, 2004.

RUIZ-MATUTE, A. I. *et al.* Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 879, n. 17-18, p. 1226-1240, 2011.

RYAN, S.; O'GORMAN, D. M.; NOLAN, Y. M. Evidence that the Marine-derived Multi-mineral Aquamin has Anti-inflammatory Effects on Cortical Glial-enriched Cultures. *Phytotherapy Research*, v. 25, n. 5, p. 765-767, 2011.

SACHS, D. *et al.* Cooperative role of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n. 1, p. 72-83, 2011.

SANZ, M. L.; MARTINEZ-CASTRO, I. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, v. 1153, n. 1-2, p. 74-89, 2007.

SILVA, M. D. C. *et al.* Carbohydrate, glycopeptide and protein-components of the lichen *sticta* sp and effect of storage. *Phytochemistry*, v. 33, n. 3, p. 547-552, 1993.

SINGTHONG, J. *et al.* Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, v. 58, n. 4, p. 391-400, 2004.

SOARES, C. M. *Estudo químico da alga Lithothamnion calcareum e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos*. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

STRAND, V.; SINGH, J. A. Improved health-related quality of life with effective disease modifying antirheumatic drugs: evidence from randomized controlled trials. *American Journal of Managed Care*, v. 13, n. 9, p. S237-S251, 2007.

TANGELDER, G. J.; ARFORS, K. E. Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood*, v. 77, n. 7, p. 1565-1571, 1991.

TAPIE, N. *et al.* Determination of galactose and mannose residues in natural galactomannans using a fast and efficient high-performance liquid chromatography/UV detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1181, n. 1-2, p. 45-50, 2008.

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

USOV, A. I.; BILAN, M. I.; KLOCHKOVA, N. G. Polysaccharides of algae. Polysaccharide composition of several calcareous red alga: isolation of alginate from *Corallina pirulifera* P. ET. R. (Rhodophyta, Corallinaceae). *Botanica Marina*, v. 38, n. 1, p. 43-51, 1995 *apud* BILAN, M. I.; USOV, A. I. Polysaccharides of calcareous algae and their effect on the calcification process. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 27, n. 1, p. 2-16, 2001.

VEIHELMANN, A. *et al.* A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Research in Experimental Medicine*, v. 198, n. 1, p. 43-54, 1998.

VIVANCOS, G. G. *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 3, p. 391-399, 2004.

WILKS, K. M.; WOELKERLING, W. J. An account of southern australian species of *Lithothamnion* (Corallinaceae, Rhodophyta). *Australian Systematic Botany*, v. 8, n. 4, p. 549-583, 1995.

WILLIAMS, A. S. *et al.* Interferon-gamma protects against the development of structural damage in experimental arthritis by regulating polymorphonuclear

neutrophil influx into diseased joints. *Arthritis and Rheumatism*, v. 56, n. 7, p. 2244-2254, 2007.

WIPKE, B. T.; ALLEN, P. M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*, v. 167, n. 3, p. 1601-1608, 2001.

WITVROUW, M.; DECLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology*, v. 29, n. 4, p. 497-511, 1997.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 211-215, 1963a *apud* MELLINGER, C. G. *Caracterização estrutural e atividade biológica de carboidratos de Phyllanthus niruri (quebra-pedras) 2006*. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 65-68, 1963b *apud* MELLINGER, C. G. *Caracterização estrutural e atividade biológica de carboidratos de Phyllanthus niruri (quebra-pedras) 2006*. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

WONG, P. K. K. *et al.* Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 54, n. 1, p. 158-168, 2006.

YABUR-PACHECO, R.; RIOSMENA-RODRIGUEZ, R. Rhodolith bed composition in the southwestern Gulf of California, México. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, v. 8, p. 37-47, 2007.

ZHANG, Q. *et al.* Effects of the polysaccharide fraction of *Urtica fissa* on castrated rat prostate hyperplasia induced by testosterone propionate. *Phytomedicine*, v. 15, n. 9, p. 722-727, 2008.

ZOR, T.; SELIGER, Z. Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, v. 236, n. 2, p. 302-308, 1996.