

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CAMILA MALAFAIA LEITE**

**Caracterização química e espectroscópica de polissacarídeos sulfatados  
extraídos de *Spirulina sp.***

**Juiz de Fora**  
**2017**

**Camila Malafaia Leite**

**Caracterização química e espectroscópica de polissacarídeos sulfatados extraídos de *Spirulina sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Bioprospecção de Novos Fármacos.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Valquíria Pereira de Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar

**Juiz de Fora**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Leite, Camila Malafaia .

Caracterização química e espectroscópica de polissacarídeos sulfatados extraídos de *Spirulina* sp. / Camila Malafaia Leite. -- 2017. 135 p. : il.

Orientadora: Valquiria Pereira de Medeiros

Coorientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. *Spirulina* sp. 2. Polissacarídeos sulfatados. 3. Análise físico química. 4. Análise espectroscópica. I. Medeiros, Valquiria Pereira de , orient. II. Aguiar, Jair Adriano Kopke de , coorient. III. Título.

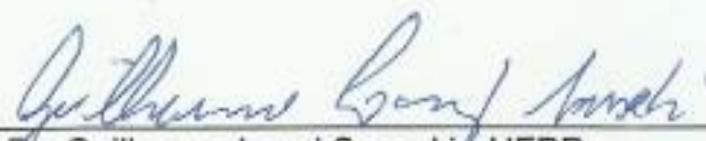
**Caracterização química e espectroscópica de polissacarídeos sulfatados  
extraídos de *Spirulina* sp.**

**Camila Malafaia Leite**

**ORIENTADORA: Valquíria Pereira de Medeiros**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 16/02/2017



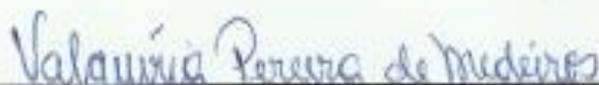
---

Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki - UFPR



---

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri - UFJF



---

Prof. Dr. Valquíria Pereira de Medeiros - UFJF

Dedico este trabalho a meus pais, Luceli e Miguel, pelo exemplo de  
pessoa e dedicação a minha educação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em todos os dias durante esses dois anos jamais deixou que eu esmorecesse, dando sabedoria para lidar com os momentos difíceis;

Ao Prof Dr Jair e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valquíria pelos ensinamentos e oportunidades oferecidas que me proporcionaram crescimento pessoal e profissional imensuráveis;

Aos meus pais, Luceli e Miguel, por estarem sempre ao meu lado, aconselhando-me e dizendo sempre as palavras certas de conforto, mas também “puxando minha orelha” quando necessário;

À minha querida avó Dilma, por apoiar sempre minha educação;

A meu irmão, Lucas, pelas descontrações, companheirismo e por aturar meu humor, nem sempre bom;

Ao Léo pelo apoio às minhas decisões, carinho, amor e paciência;

Aos meus familiares, primos, tios e sogros, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, mesmo distantes, sempre compreendendo minha ausência;

Aos meus amigos, sempre motivo de alegria, tornando cada passo dessa etapa mais fácil de ser realizada;

Aos colegas do Laboratório de Glicoconjugados por contribuírem de alguma forma na execução deste trabalho e por tornarem os momentos de trabalho mais prazerosos;

À Dra. Lenize e Dr. Luiz Fernando, e alunos do Programa de Pós-Graduação da Química Rafaella e Arthur, por todo suporte fornecido nas análises espectroscópicas;

Aos professores e alunos do Laboratório de Produtos Naturais pelo suporte nas análises da atividade antioxidante;

E se por memória, me esqueci de alguém peço desculpa, mas saiba que minha gratidão é sincera;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, principalmente, o Arlem que sempre esteve disponível para resolver os nossos problemas;

À CAPES pela bolsa concedida.

“A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

## RESUMO

*Spirulina sp* são microalgas do grupo das cianobactérias ricas em compostos com atividade biológica, sendo a antiviral, antioxidante e anticoagulante já atribuídas aos polissacarídeos sulfatados presentes nessas microalgas. No entanto, a relação entre estrutura e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados ainda não está claramente estabelecida. No presente trabalho, polissacarídeos sulfatados da biomassa comercial *Spirulina sp* foram extraídos, caracterizados e analisados quanto as atividades anticoagulante e antioxidante *in vitro*. A biomassa foi submetida a diferentes condições de extração de polissacarídeos, os quais foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0, dosagens de proteína, açúcar total, ácido urônico, teor sulfato e compostos fenólicos. Posteriormente, frações de polissacarídeos sulfatados foram submetidas a cromatografia em papel, de troca iônica e gel filtração, a eletroforese em gel agarose 1,0 % em tampão tris-borato-EDTA (TBE), pH 8,3, *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE), a  $\beta$ -eliminação e dessulfatação. Além disso, foi realizado espectroscopia de Raman, IV e RMN  $^{13}\text{C}$  em estado sólido e análise da atividade anticoagulante pelo método da USP e atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Os rendimentos de açúcar total dos polissacarídeos variaram de 2,27% a 20,23%, sendo a fração DPB, obtida do processo de lise celular e proteólise com papaína, aquela com um dos melhores rendimentos e metacromasia mais intensa na eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão PDA, característica da presença de polissacarídeos sulfatados. Dessa forma, esta fração foi escolhida para dar sequencia ao trabalho. A análise da composição química revelou a presença de sulfato, ramnose, ácido glicurônico e galactose, sendo a glicose o monossacarídeo majoritário. Além desses, sugere-se a presença do ácido aldobiurônico na estrutura dos polissacarídeos sulfatados. O peso molecular estimado para esses polissacarídeos foi próximo a 130 e 40 kDa. Quando realizado o processo de despigmentação, fração DPBdespig, observou-se que a composição química e peso molecular mantiveram-se semelhantes a fração DPB assim como as frações DPB 2,0M e DPB 3,0M, obtidas após cromatografia de troca iônica. Porém DPB 3,0M mostrou maior teor de sulfato. Ao analisar o produto das frações DPB e DPBdesp submetidos a  $\beta$ -eliminação foi observado um peso molecular estimado único, próximo a 100KDa. A análise espectroscópica revelou bandas características de polissacarídeos sulfatados em todas frações analisadas, mas a fração DPB 3,0M apresentou bandas espectroscópicas atribuídas a grupos sulfato intensas e bem definidas enquanto, as frações submetidas a dessulfatação não. Nenhuma fração analisada apresentou atividade anticoagulante pelo método utilizado. A fração DPB e DPB despig apresentaram boa atividade antioxidante, em torno de 45% no método de sequestro do DPPH e 55% no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. A cinética da atividade antioxidante sugeriu que as frações atuem em mecanismos primários da oxidação. Essas mesmas frações quando submetidas a  $\beta$ -eliminação e dessulfatação tiveram suas atividade antioxidante reduzida. Os resultados apresentados sugerem que, o método de lise celular seguido por proteólise proporcionou o melhor rendimento de polissacarídeos sulfatados com atividade antioxidante de *Spirulina sp*, relacionada, possivelmente, a estrutura destes polissacarídeos.

**Palavras-chave:** *Spirulina sp*, polissacarídeos sulfatados, análises químicas e espectroscópicas, antioxidante.

## ABSTRACT

*Spirulina sp* are microalgae of the group of cyanobacteria rich in compounds with biological activity, being the antiviral, antioxidant and anticoagulant activity already attributed to sulphated polysaccharides present in these microalgae. However, the relationship between structure and biological activity of sulphated polysaccharides are not yet clearly established. In this work, polysaccharides from the commercial biomass *Spirulina sp* were extracted, characterized and analyzed for anticoagulant and antioxidant activities *in vitro*. The biomass was submitted to different conditions of polysaccharides extraction, those were analyzed by electrophoresis in 0.5% agarose gel in 0.05M buffer of 1,3-diaminopropane acetate (PDA) pH 9.0, dosages of protein, total sugar, uronic acid, sulfate and phenolic compounds. Subsequently, the fractions of sulfated polysaccharides were subjected to paper, ion exchange and gel filtration chromatographies, electrophoresis in 1.0% agarose gel in tris-borate-EDTA (TBE) buffer pH 8.3, Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE),  $\beta$ -elimination and desulfation. In addition, were performed Raman, IR and NMR C<sup>13</sup> solid state spectroscopy and analysis of the anticoagulant activity by the USP method and antioxidant activity by sequestration of the DPPH radical and  $\beta$ -carotene / linoleic acid system. The total sugar yields of the polysaccharides ranged from 2.27% to 20.23%. The DPB fraction obtained from the cell lysis process and papain proteolysis it presented one of the best yields and the most intense metachromasia in the electrophoresis in gel 0.5% agarose in PDA buffer, characteristic of the presence of sulphated polysaccharides. Thus, this fraction was chosen to follow the work. The analysis of the chemical composition revealed the presence of sulfate, rhamnose, glucuronic acid and galactose, being the glucose the major monosaccharide. Beside those, the presence of aldobionuronic acid in the structure of the sulfated polysaccharides is suggested. The estimated molecular weight for those polysaccharides was near to 130 and 40 kDa. When the depigmentation process was performed (DPBdespig fraction) it was observed that the chemical composition and molecular weight remained similar to the DPB fraction as well as the DPB 2.0M and DPB 3.0M fractions obtained after ion exchange chromatography. However, DPB 3.0M showed higher sulphate content. Analyzing the product of the fractions DPB and DPBdespig submitted to  $\beta$ -elimination, was observed a single estimated molecular weight, close to 100kDa. The spectroscopic analysis revealed characteristic bands of sulphated polysaccharides in all analyzed fractions, but the fraction DPB 3,0 M showed bands attributed to sulfate groups intense and well defined, while the fractions submitted to desulphation not. No analyzed fraction presented anticoagulant activity by the method used. The fraction DPB and DPBdespig showed good antioxidant activity, around 45% by DPPH sequestration method and 55% by  $\beta$ -carotene / linoleic acid system. The kinetics of the antioxidant activity suggested that the fractions act on the primary mechanisms of oxidation. Those same fractions when subjected to  $\beta$ -elimination and desulphation had their antioxidant activity reduced. The results suggest that the cell lysis method followed by proteolysis provided the best yield of sulfated polysaccharides with antioxidant activity from *Spirulina sp*, possibly related to the structure those polysaccharides.

**Keywords:** *Spirulina sp*, sulphated polysaccharides, chemical and spectroscopic analyzes, antioxidant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do condroitim sulfato fucosilado do pepino do mar.	26
Figura 2 - Estruturas dos principais polissacarídeos encontrados nas algas verde, vermelha e marrom.	27
Figura 3 - Cascata de coagulação sanguínea.	29
Figura 4 - Sistema fibrinolítico.	30
Figura 5 - Estrutura hexassacarídica básica da heparina.	31
Figura 6 - Formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir da formação da H <sub>2</sub> O.	34
Figura 7 - Filamento <i>Spirulina sp.</i>	36
Figura 8 - Morfologia celular de cianobactéria.	37
Figura 9 - Spirulam (H-SP).	38
Figura 10 - Filamento em espiral da <i>Spirulina SP.</i>	44
Figura 11 - Extração de polissacarídeos em diferentes condições.	54
Figura 12 - Modelo de curva de decaimento obtida no sistema $\beta$ -caroteno - ácido linoleico e obtenção das tangentes para o cálculo dos fatores cinéticos F1 e F2.	67
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações de polissacarídeos sulfatados obtidos por extração aquosa ou alcalina.	68
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M pH 9,0 dos polissacarídeos sulfatados extraídos após proteólise com papaína.	70
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M pH 9,0 dos polissacarídeos sulfatados extraídos após proteólise com papaína ou ALCALASE.	72
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato 0,05 M pH 9,0 dos polissacarídeos extraídos após lise celular acompanhada por proteólise com papaína.	73
Figura 17 - Cromatogramas em sistema ácido isobutírico:hidróxido de amônia 1,25 M (5:3 v/v) dos polissacarídeos DPB e DPBdespig hidrolisados com HCl 6M por 1 h (A), 2 h (B), 4 h (C), 6 h (D) e 8 h (E).	76

Figura 18 - Cromatograma em sistema ácido isobutírico:hidróxido de amônia 1,25 M (5:3 v/v) dos polissacarídeos DPB e DPBdespig hidrolisados com HCl 6M por 1 h e Rf para compostos das frações e padrões.	77
Figura 19 – Eletrofluorograma no sistema Tris-Glcina-Borato pH dos monossacarídeos das frações DPB e DPBdespig.	78
Figura 20 – Gel de agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3 para estimar o peso molecular modal das frações DPB e DPBdespig.	79
Figura 21 - Perfil cromatográfico das frações DPB e DPBdespig em coluna de gel filtração <i>Q-Sephadex G-200</i> .	80
Figura 22 - Espectros de Raman das frações DPB (A) e DPBdespig (B).	81
Figura 23 - Espectros de infravermelho das frações DPB (A) e DPBdespig (B).	83
Figura 24 - Espectros de RMN em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB e DPBdespig.	84
Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações obtidas por cromatografia de troca iônica ( <i>Q-Sepharose</i> ) em escala analítica.	85
Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações obtidas por cromatografia de troca iônica ( <i>Q-Sepharose</i> ) em escala preparativa.	87
Figura 27 - Eletrofluorograma no sistema Tris-Glcina-Borato pH dos monossacarídeos das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M.	89
Figura 28 - Gel de agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3 para peso molecular modal das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M.	90
Figura 29 - Espectros de Raman das frações DPB (A), DPB 2,0M (B) e DPB 3,0M (C).	91
Figura 30 - Espectros de infravermelho das frações DPB (A), DPB 2,0M (B) e DPB 3,0M (C).	93
Figura 31 – Espectros de RMN em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB, DPB 2,0M e DPBM 3,0M.	95
Figura 32 - Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações DPB e DPBdespig modificadas por $\beta$ -eliminação.	97

Figura 33 - Eletrofluorograma no sistema Tris-Glicina-Borato pH dos monossacarídeos das frações DPB e DPBdespig modificadas por $\beta$ -eliminação.	99
Figura 34 - Gel de agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3 para peso molecular modal das frações DPB e DPBdespig modificadas por $\beta$ -eliminação.	100
Figura 35 - Perfil cromatográfico em coluna de gel filtração <i>Q-Sephadex G-200</i> das frações DPB e DPBdespig modificadas por $\beta$ -eliminação.	101
Figura 36 - Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações DPB e DPBdespig modificadas por dessulfatação.	102
Figura 37 - Espectros de Raman das frações DPB (A) DPB $\beta$ -elim (B) e DPB dessulf (C).	104
Figura 38 - Espectros de Raman das frações DPBdespig (A) DPBdespig $\beta$ -elim (B) e DPBdespig dessulf (C).	104
Figura 39 - Espectros de infravermelho das frações DPB (A), DPB $\beta$ elim (B) e DPB dessulf (C).	107
Figura 40 - Espectros de infravermelho das frações DPBdespig (A), DPBdespig $\beta$ elim (B) e DPBdespig dessulf (C).	107
Figura 41 - Espectros de RMN em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB, DPB $\beta$ -elim e DPB dessulf.	110
Figura 42 – Espectros de RMN em estado sólido (CP-MAS) das frações DPBdespig, DPBdespig $\beta$ -elim e DPBdespig dessulf.	110
Figura 43 - Sequestro do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das frações de polissacarídeos obtida da biomassa seca.	112
Figura 44 - Sequestro do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das frações de polissacarídeos obtida da biomassa seca despigmentada.	113
Figura 45 - Inibição da oxidação do sistema $\beta$ -caroteno-ácido linoleico das frações de polissacarídeos obtida da biomassa seca.	114
Figura 46 - Inibição da oxidação do sistema $\beta$ -caroteno-ácido linoleico das frações de polissacarídeos obtida da biomassa seca despigmentada.	115
Figura 47 - Estrutura ácido aldobiurônico.	122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento da extração na condição alcalina (Métodos 3.2.1.1). Polissacarídeos precipitados com etanol PA.	69
Tabela 2 – Rendimento da extração na condição por proteólise seguida da precipitação com diferentes solventes orgânicos (Métodos 3.2.1.2)	71
Tabela 3 – Rendimento da extração na condição de proteólise com diferentes enzimas (Métodos 3.2.1.3).	72
Tabela 4 – Rendimento da extração na condição de lise celular acompanhada por proteólise (Métodos 3.2.1.4).	74
Tabela 5 – Composição química das frações DPB e DPBdespig.	74
Tabela 6 – Porcentagem relativa de monossacarídeos das frações DPB e DPBdespig determinada por FACE em tampão tris-Glcina-borato pH 8,3.	79
Tabela 7 – Bandas dos espectros do Raman das frações DPB e DPBdespig.	82
Tabela 8 – Bandas dos espectros do Infravermelho das frações DPB e DPBdespig.	83
Tabela 9 – Sinais do RMN em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB e DPBdespig.	84
Tabela 10 – Dosagens químicas das frações purificadas em cromatografia de troca iônica em <i>Q-Sepharose Fast Flow</i> .	88
Tabela 11 – Porcentagem relativa de monossacarídeos das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M determinada por FACE em tampão tris-Glcina-borato pH 8,3.	89
Tabela 12 – Bandas dos espectros do Raman das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M.	92
Tabela 13 –. Bandas dos espectros do Infravermelho das frações DPB, DPB 2,0M e DPB 3,0M.	94
Tabela 14 – Sinais do RMN em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB 2,0M e 3,0M.	96
Tabela 15 – Caracterização química das frações DPB e DPBdespig antes e após modificação por $\beta$ -eliminação.	98

Tabela 16 – Porcentagem relativa de monossacarídeos das frações DPB $\beta$ -elim e DPBdespig $\beta$ -elim determinada por FACE em tampão tris-Glcina-borato pH 8,3.	99
Tabela 17 – Caracterização química das frações DPB e DPBdespig antes e após modificação por dessulfatação.	103
Tabela 18 – Bandas dos espectros do Raman das frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente.	106
Tabela 19 – Bandas dos espectros do IV das frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente.	109
Tabela 20 – Sinais de RMN em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente.	111
Tabela 21 - Parâmetros cinéticos (F1 e F2) do potencial antioxidante no sistema $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico.	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aam	Absorbância das amostras
Ac	Absorbância do controle
Ác Gal	Ácido Galacturônico
Ác Glc	Ácido Glcurônico
ALT	Alanina Aminotransferase
AMAC	Cianoborohidreto de sódio e 2-aminoacridona
APS	Persulfato de amônio
AST	Aspartato Aminotransferase
Ca-SP	Cálcio-spirulam
CAPM	Cininogênio di auto peso molecular
CETAVLON	Brometo de cetiltrimetilamônio
CS	Condroitim sulfato
DB	Fração de polissacarídeos extraídos com lise celular (Condição 4 de extração)
DPB	Fração de polissacarídeos extraídos por lise celular e proteólise com papaína (Condição 4 de extração)
DPB 0,5M	Fração de polissacarídeos, extraídos por lise celular e proteólise com papaína, eluidos com NaCl 0,5M da cromatografia de troca iônica <i>Q-Sepharose Fast Flow</i>
DPB 1,0M	Fração de polissacarídeos, extraídos por lise celular e proteólise com papaína, eluidos com NaCl 1,0 M da cromatografia de troca iônica <i>Q-Sepharose Fast Flow</i>
DPB 2,0M	Fração de polissacarídeos, extraídos por lise celular e proteólise com papaína, eluidos com NaCl 2,0 M da cromatografia de troca iônica <i>Q-Sepharose Fast Flow</i>
DPB 3,0M	Fração de polissacarídeos, extraídos por lise celular e proteólise com papaína, eluidos com NaCl 3,0M da cromatografia de troca iônica <i>Q-Sepharose Fast Flow</i>
DPB $\beta$ -elim	Fração de polissacarídeos, extraídos por lise celular e proteólise com papaína, após modificação química por $\beta$ -eliminação
DPB dessulf	Fração de polissacarídeos, extraídos por lise celular e proteólise com papaína, após modificação química por dessulfatação

DPBdespig	Fração de polissacarídeos extraídos por lise celular e proteólise com papaína a partir da biomassa seca despigmentada com solventes orgânicos (Condição 4 de extração)
DPBdesp $\beta$ -elim	Fração de polissacarídeos, extraídos por lise celular e proteólise com papaína a partir da biomassa seca despigmentada com solventes orgânicos, após modificação química por $\beta$ -eliminação
DPBdespig dessulf	Fração de polissacarídeos, extraídos por lise celular e proteólise com papaína a partir da biomassa seca despigmentada com solventes orgânicos, após modificação química por dessulfatação
dm	Distância percorrida pela fase móvel
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Dexoribonucleico
DPPH	Radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil
DS	Dermatam sulfato
F30	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína e precipitados com 30 % V de acetona PA (Condição 2 de extração)
F50	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína e precipitados com 50 % V de acetona PA (Condição 2 de extração)
F70	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína e precipitados com 70 % V de acetona PA (Condição 2 de extração)
F100	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína e precipitados com 100 % V de acetona PA (Condição 2 de extração)
FACE	<i>Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis</i>
FV	Fator V
FVII	Fator VI Icircular
FVIIa	Fator VII circular ativado
FVIII	Fator VIII
FVIIIa	Fator VIII ativado
FIX	Fator IX

FIXa	Fator IX ativado
FX	Fator X
FXa	Fator x ativado
FXA-FVa	Protrobinase
FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator XII
FXIIa	Fator XII ativado
GAG	Glicosaminoclicanos
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HS	Heparam sulfato
H-SP	Spirulam
IFN- $\gamma$	Interferon
IV	Inravermelho
KDa	Quilodaltom
M	Molar
Man	Manose
Na-SP	Sódio-spirulam
n.d	Não detectável
NK	Células Naturais <i>Killer</i>
PAI-1	Inibidor do Ativador de Plasminogênio tipo 1
PAI-2	Inibidor do Ativador de Plasminogênio tipo 2
Palcalase	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com alcalase (Condição 3 de extração)
PC	Pró-enzima Precalcreína
PDA	Tampão 1,3-diaminopropano acetato
PDF	Produtos de Degradação Solúveis de Fibrina
PEtOH	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína e precipitados com etanol PA (Condição 2 de extração)
PEtOH/NaCl	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína e precipitados com etanol PA na presença de NaCl 1 M (Condição 2 de extração)

PH <sub>2</sub> O/CETAVLON	Fração de polissacarídeos extraídos com água e precipitados com CETAVLON 1% (Condição 1 de extração)
PH <sub>2</sub> O/EtOH	Fração de polissacarídeos extraídos com água e precipitados com etanol PA (Condição 1 de extração)
PNaOH/CETAVLON	Fração de polissacarídeos extraídos com NaOH 3% e precipitados com CETAVLON 1% (Condição 1 de extração)
PNaOH/EtOH	Fração de polissacarídeos extraídos com NaOH 3% e precipitados etanol PA (Condição 1 de extração)
PM	Peso Molecular
PMetOH	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína e precipitados com metanol (Condição 2 de extração)
PMetOH/NaCl	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína e precipitados com metanol PA na presença de NaCl 1 M (Condição 2 de extração)
Ppapaína	Fração de polissacarídeos extraídos por proteólise com papaína (Condição 3 de extração)
Ram	Ramnose
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
S/A	Razão entre o conteúdo de sulfato e açúcar total
TBE	<i>Tampão Tris-Borato-EDTA</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametiletilenodiamino
TF	Fator Tecidual
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
t-PA	Ativador de Plasminogênio do tipo tecidual
TP	Tempo de Protrombina
TT	Tempo de Trombina
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial ativada
U/A	Razão entre o conteúdo de ácido urônico e açúcar total
u- PA	Ativador de Plasminogênio do tipo uroquinase
UV	Ultravioleta
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1	JUSTIFICATIVA.....	23
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
1.2.1	<b>Polissacarídeos - considerações iniciais</b> .....	25
1.2.2	<b>Polissacarídeos sulfatados</b> .....	25
1.2.3	<b>Atividades biológicas</b> .....	28
1.2.3.1	<i>Atividade Anticoagulante</i> .....	28
1.2.3.2	<i>Atividade Antioxidante</i> .....	33
1.2.4.	<b><i>Spirulina sp.</i></b> .....	35
1.2.4.1	<i>Atividade antioxidante da Spirulina sp.</i> .....	39
1.2.4.2	<i>Atividade anticoagulante da Spirulina sp.</i> .....	40
1.2.4.3	<i>Outras atividades descritas para Spirulina sp.</i> .....	41
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
3.1	<b>MATERIAS</b> .....	44
3.1.1	<b>Microalga <i>Spirulina sp.</i></b> .....	44
3.1.2	<b>Reagentes</b> .....	45
3.1.2.1	<i>Enzimas</i> .....	45
3.1.2.2.	<i>Eletroforese</i> .....	45
3.1.2.3	<i>Monossacarídeos padrões</i> .....	47
3.1.2.4	<i>Glicosaminoglicanos padrões</i> .....	47
3.1.2.5	<i>Demais padrões utilizados</i> .....	47
3.1.2.6	<i>Resinas Cromatográficas</i> .....	48
3.1.2.7	<i>Reagentes químicos de uso geral</i> .....	48
3.1.3	<b>Equipamentos</b> .....	48
3.2	<b>MÉTODOS</b> .....	50
<b>3.2.1</b>	<b>Extração de polissacarídeos de <i>Spirulina sp.</i></b> .....	50
3.2.1.1	<i>Condição 1 – Extração alcalina</i> .....	50
3.2.1.2	<i>Condição 2 – Proteólise seguida de precipitação com diferentes solventes orgânicos</i> .....	51

3.2.1.3	<i>Condição 3– Proteólise com diferentes enzimas proteolíticas.....</i>	52
3.2.1.4	<i>Condição 4– Lise celular acompanhada de proteólise com papaína.....</i>	52
<b>3.2.2</b>	<b>Cromatografia.....</b>	<b>55</b>
3.2.2.1	<i>Cromatografia de troca-iônica (Q-Sepharose Fast Flow).....</i>	55
3.2.2.2	<i>Cromatografia de gel filtração Sephadex G-200.....</i>	56
3.2.1.3	<i>Cromatografia em papel.....</i>	56
<b>3.2.3</b>	<b>Eletroforese.....</b>	<b>57</b>
3.2.3.1	<i>Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA).....</i>	57
3.2.3.2	<i>Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE)....</i>	57
3.2.3.3	<i>FACE - Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis.....</i>	58
<b>3.2.4</b>	<b>Dosagens Químicas.....</b>	<b>60</b>
3.2.4.1	<i>Dosagem de Açúcar Total.....</i>	60
3.2.4.2	<i>Dosagem de Ácido Urônico.....</i>	60
3.2.4.3	<i>Dosagem de Sulfato Inorgânico.....</i>	60
3.2.4.4	<i>Dosagem de Proteína.....</i>	61
3.2.4.5	<i>Dosagem de Fenólicos Totais.....</i>	61
3.2.5	<b>Modificação química dos polissacarídeos sulfatados.....</b>	<b>62</b>
3.2.5.1	<i>β-eliminação.....</i>	62
3.2.5.2	<i>Dessulfatação.....</i>	62
3.2.6	<b>Análises espectroscópicas.....</b>	<b>63</b>
3.2.6.1	<i>Espectroscopia de Raman.....</i>	63
3.2.6.2.	<i>Espectroscopia de Infravermelho.....</i>	63
3.2.6.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</i>	63
3.2.7	<b>Atividade anticoagulante.....</b>	<b>64</b>
3.2.8	<b>Atividade antioxidante.....</b>	<b>64</b>
3.2.8.1	<i>Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....</i>	64
3.2.8.2	<i>Oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.....</i>	65
3.2.8.3	<i>Estudo cinético da atividade antioxidante pelo ensaio em sistema β-caroteno / ácido linoleico.....</i>	66
3.2.9	<b>Análise estatística.....</b>	<b>67</b>
4	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
4.1	<b>EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Spirulina sp.</i>.....</b>	<b>68</b>

4.1.1	<b>Extração de políssacarídeos da microalga <i>Spirulina sp.</i></b> .....	68
4.1.2	<b>Caracterização físico-química e espectroscópica das frações DPB e DPBdespig</b> .....	74
4.1.2.1	<i>Composição química</i> .....	74
4.1.2.2	<i>Composição monossacarídica</i> .....	75
4.1.2.3	<i>Peso molecular modal</i> .....	79
4.1.2.4	<i>Caracterização espectroscópica</i> .....	80
4.2	<b>PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS <i>Spirulina sp</i> POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM Q-SEPHAROSE (FAST FLOW)</b> .....	85
4.2.1	<b>Cromatografia de troca iônica em <i>Q-Sepharose Fast Flow</i> em escala analítica</b> .....	85
4.2.2	<b>Cromatografia de troca iônica em <i>Q-Sepharose Fast Flow</i> em escala preparativa</b> .....	86
4.2.3	<b>Caracterização físico-química e espectroscópica das frações DPB 2,0 e 3,0M</b> .....	87
4.2.3.1	<i>Composição química</i> .....	87
4.2.3.2	<i>Composição monossacarídica</i> .....	88
4.2.3.3	<i>Peso molecular modal</i> .....	90
4.2.3.4	<i>Caracterização espectroscópica</i> .....	91
4.3	<b>MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DE <i>Spirulina sp.</i></b> .....	96
4.3.1	<b><math>\beta</math>-eliminação</b> .....	96
4.3.1.1	<i>Caracterização físico-química e espectroscópica das <math>\beta</math>-eliminação</i> .....	97
4.3.1.1.1	<i>Composição química</i> .....	97
4.3.1.1.2	<i>Composição monossacarídica</i> .....	98
4.3.1.1.3	<i>Peso molecular modal</i> .....	100
4.3.2	<b>Dessulfatação</b> .....	101
4.3.3	<b>Caracterização espectroscópica das frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente por <math>\beta</math>-eliminação e dessulfatação</b> .....	103
4.4	<b>ATIVIDADE BIOLÓGICA</b> .....	111
4.4.1	<b>Atividade anticoagulante</b> .....	111
4.4.2	<b>Atividade antioxidante</b> .....	112
4.4.2.1	<i>Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)</i> .....	112

4.4.2.2	<i>Oxidação do sistema <math>\beta</math>-caroteno-ácido linoleico e cinética da atividade antioxidante.....</i>	114
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	118
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	128
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	130

## 1 INTRODUÇÃO.

### 1.1 JUSTIFICATIVA.

Nas últimas décadas, as propriedades biológicas dos carboidratos têm despertado grande interesse e sido alvo de vários estudos, especialmente os polissacarídeos sulfatados. Estes apresentam grupamentos sulfatos esterificados em uma ou mais hidroxilas de um resíduo de monossacarídeo constituinte da cadeia polissacarídica, e tais substituições estruturais são de grande importância para a atividade biológica do composto (LU *et al.*, 2008; AHMED *et al.*, 2014).

Os polissacarídeos sulfatados são muito difundidos na natureza, presentes em espécies do reino Monera ao Animalia, sendo sua estrutura, composição química e funções biológicas específicas para cada espécie. Essas moléculas são capazes de se ligarem com proteínas, formando macromoléculas complexas, como os proteoglicanos e glicoproteínas, podendo interagir com proteínas de membrana e da matriz extracelular e, conseqüentemente, participam de processos que envolvem o desenvolvimento, diferenciação, adesão e sinalização celular. Dessa forma, os polissacarídeos sulfatados apresentam um grande potencial para aplicações médicas, farmacêuticas e biotecnológicas, como por exemplo, no desenvolvimento de biomateriais, regeneração de tecido e desenvolvimento de drogas (VARKI e LOWE, 2009; SENNI *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos sulfatados mais estudados são os glicosaminoglicanos (GAG), presentes em animais (terrestres e marinhos), os quais exibem atividades biológicas sobre processos fisiológicos e patológicos, tais como a heparina, GAG com atividade anticoagulante, usada no tratamento de doenças cardiovasculares e, o condroitim sulfato, sendo utilizado no tratamento de artrite. Além desses exemplos, existe uma ampla variedade funcional descrita para os GAG, que estão diretamente relacionadas a diversidade química e estrutural desses polímeros, como o padrão de sulfatação (SENNI *et al.*, 2011; WANG, WANG e GUAN, 2012)

Os polissacarídeos de origem marinha apresentam uma enorme variedade estrutural ainda pouco explorada e, geralmente, exibem características estruturais, tais como presença de ácido urônico e grupos sulfato, que os distinguem dos polissacarídeos de plantas terrestres, mas os tornam semelhantes aos GAG. Dessa forma, podem ser considerados como uma nova e extraordinária fonte de compostos

químicos para descoberta e desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. (WANG, WANG e GUAN, 2012).

Microrganismos marinhos, incluindo bactérias, fungos e microalgas, podem viver em *habitats* complexos e sob condições extremas e de estresse, tais como alta pressão, alto teor salino, baixa temperatura e escassez de nutrientes. Na adaptação para sobreviver às novas condições ambientais eles produzem substâncias ativas únicas, dentre eles os polissacarídeos (WANG, WANG e GUAN, 2012; DE MORAIS *et al.*, 2015).

*Spirulina sp* é uma microalga marinha que vem sendo usada como fonte de suplemento alimentar tanto para o homem, como para os animais. Recentemente, tem se despertado grande interesse devido a seu conteúdo de compostos bioativos, tais como proteínas, polissacarídeos, lipídeos, pigmentos, vitaminas, polifenóis, entre outros, que apresentam potenciais efeitos terapêuticos (atividade antioxidante, antitumoral, imunoestimulador, antiviral, dentre outras) (HOSEINI, DARANI e MOZAFARI, 2013; SOTIROUDIS e SOTIROUDS, 2013).

Mesmo com todos os estudos sobre os potenciais efeitos biológicos dos polissacarídeos da *Spirulina sp*, apenas um polissacarídeo sulfatado foi isolado e caracterizado, o chamado Spirulam obtido da *S. platensis* (Lee *et al.*, 1998). Muitos trabalhos relatam as atividades biológicas de extratos de polissacarídeos de *Spirulina sp*, porém pouco se relata sobre as características estruturais e possíveis relações com as atividades biológicas.

Com base nos relatos apresentados, o presente estudo busca conhecer a estrutura de polissacarídeos sulfatados extraídos da biomassa comercial de *Spirulina sp*, bem como, a relação entre a complexidade estrutural destes polissacarídeos sulfatados e a atividade biológica por estes desempenhada.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

### 1.2.1 Polissacarídeos - considerações iniciais.

Polissacarídeos são macromoléculas, lineares ou ramificadas, formados por unidades de monossacarídeos, unidos por ligações Glicosídicas, que diferem quanto ao tipo de monossacarídeo, comprimento da cadeia e quanto ao tipo de ligação Glicosídica. Estas características são importantes para a estrutura tridimensional do polímero e, conseqüentemente, para as funções biológicas por estes desempenhadas (BERTOZZI e RABUKA, 2009).

As funções biológicas dos polissacarídeos podem ainda ser moduladas por modificações em sítios específicos da cadeia polissacarídica, as quais ocorrerem após a formação do esqueleto do carboidrato, envolvendo uma variedade de grupos funcionais, em geral, processos de derivatização de grupos hidroxil ou amino, acilação, sulfatação, metilação e fosforilação. Essas modificações estruturais acarretam no aumento da complexidade estrutural e funcional dos polissacarídeos. Além disso, esses polímeros podem apresentar-se ligados covalentemente a proteínas ou lipídeos (Glicoproteínas, Glicolípidos e proteoGlicanos), o que os permite atuarem em processos metabólicos de um organismo (MUTHANA, CAMPBELL e GILDERSLEEVE, 2013).

Desta forma, estabelecer a relação entre atividade biológica e estrutura de polissacarídeos torna-se uma tarefa difícil devido à grande variedade estrutural que estes polímeros podem assumir. Porém, uma compreensão básica de sua estrutura e composição torna-se essencial para a interpretação de possíveis mecanismos para suas propriedades biológicas, e talvez, chegar a possíveis novas terapias para doenças infecciosas, inflamatórias, neoplásicas e degenerativas que possam estar ligadas, direta ou indiretamente, aos carboidratos.

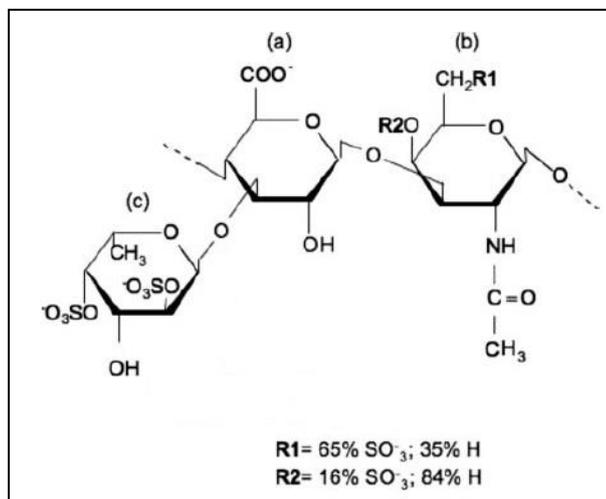
### 1.2.2 Polissacarídeos sulfatados.

Os polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo complexo de macromoléculas aniônicas com uma vasta gama de propriedades biológicas, podendo ser encontrados em uma grande variedade de organismos, dentre eles os mamíferos,

invertebrados (COSTA *et al.*, 2010), macro e microalgas (WIJESEKARA, PANGESTUTI e KIM, 2011). As propriedades biológicas estão diretamente relacionadas a presença e posição espacial do grupo sulfato na macromolécula (TOIDA, CHAIDEDGUMJORN e LIBHARDT, 2003).

Os principais polissacarídeos sulfatados encontrados em tecidos animais são os GlicosaminoGlicanos (GAG). Esses polissacarídeos são compostos de unidades repetidas de um ácido urônico (ou um açúcar neutro) e um açúcar aminado, podendo ser sulfatados (condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparina/ heparam sulfato e queratam sulfato) ou não - sulfatados (ácido hialurônico). Os GAGs podem ser encontrados na matriz extracelular, no compartimento celular ou em sua superfície, agindo em processos fisiológicos e patológicos do organismo (SENNI *et al.*, 2011).

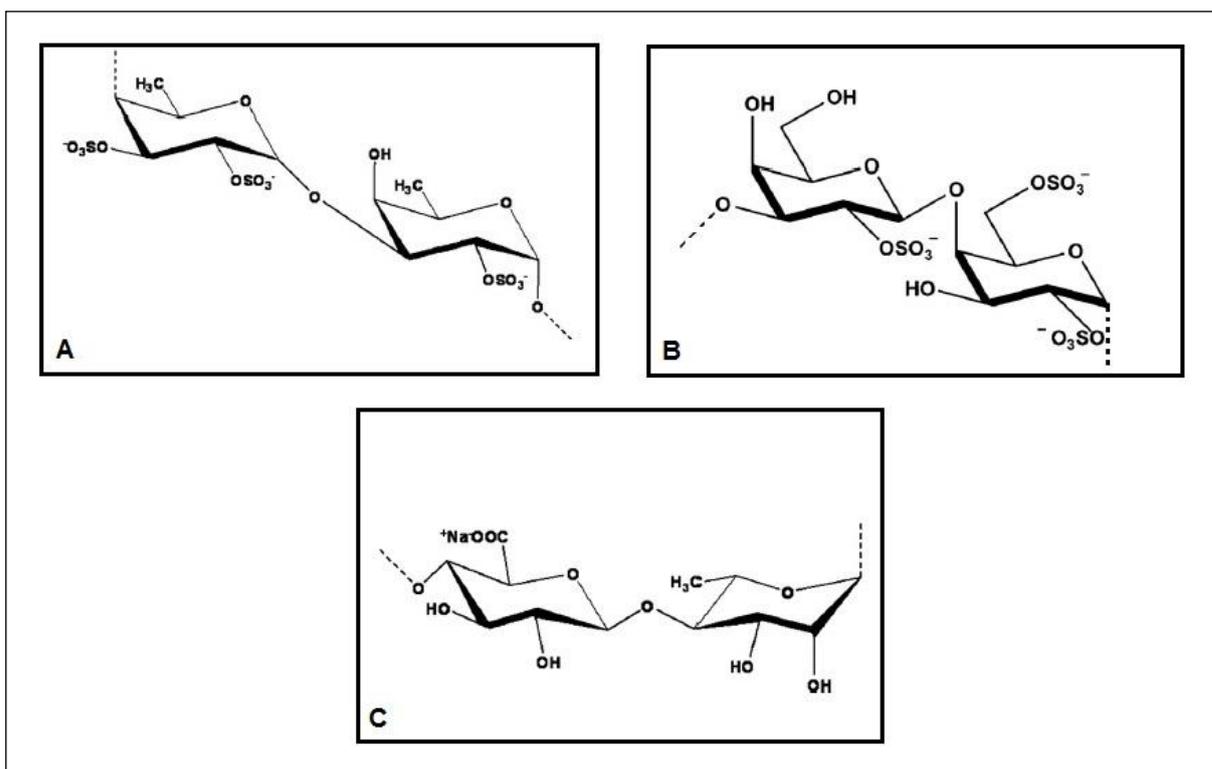
Polissacarídeos sulfatados de origem marinha apresentam uma enorme variedade estrutural sendo considerados como uma nova fonte de compostos naturais para a descoberta de novos fármacos. Tais compostos, em geral, apresentam em sua estrutura a presença de ácido urônico e de grupo sulfato, o que os assemelhariam aos GAG de mamífero, como por exemplo, o condroitim sulfato fucosilado extraído do pepino do mar, o qual difere do condroitim sulfato de mamífero pela presença de fucose sulfatada (Figura 1) (SENNI *et al.*, 2011; WANG, WANG e GUAN, 2012).



**Figura 1. Estrutura do condroitim sulfato fucosilado do pepino do mar.** A cadeia principal deste polissacarídeo sulfatado é constituída por unidades repetidas do dissacarídeo de ácido-D-glucurônico (a) e *N*-acetil-D-glucosamina (b), a mesma estrutura do condroitim sulfato de mamíferos. No entanto, no caso do condroitim do pepino do mar, os resíduos do ácido-D-glucurônico possuem fucose 2,4-disulfatados (c) ligadas no C-3. A maior parte da *N*-acetil-D-glucosamina é 6-sulfatada (53%), mas, pequenas quantidades de 4,6-dissulfatado (12%), 4-sulfatado (4%) e não sulfatado (31%) são observadas. FONTE: adaptado de BORSIG *et al.*, 2007.

As algas marinhas são uma fonte importante de polissacarídeos sulfatados, variando em sua estrutura de espécie para espécie. Assim, cada novo polissacarídeo sulfatado purificado a partir de uma alga marinha é um novo composto com estruturas únicas e, conseqüentemente, com novos potenciais para atividades biológicas (COSTA *et al.*, 2010).

Os polissacarídeos sulfatados são encontrados em quantidades variáveis nos três grandes grupos de macroalgas marinhas pertencentes aos filos Chlorophyceae (alga verde), Rhodophyceae (algas vermelhas) e Phaeophyceae (algas marrons ou pardas). Os principais polissacarídeos sulfatados encontrados em algas marinhas incluem os fucoidans (heteropolissacarídeos) e fucanas (homopolissacarídeos) nas algas marrons, carragenanas algas vermelhas e as ulvanas nas algas verdes (Figura 2) (WIJESEKARA, PANGESTUTI e KIM, 2011).



**FIGURA 2. Estruturas dos principais polissacarídeos encontrados nas algas verde, vermelha e marrom.** A: estrutura química da unidade dissacarídica repetida de fucoidan; B: estrutura química da unidade dissacarídica repetida de λ-carragenina; C: estrutura química da unidade dissacarídica repetida de ulvan. FONTE: adaptado de WIJESEKARA, PANGESTUTI e KIM, 2011.

Microrganismos marinhos, incluindo bactérias, fungos e microalgas, são de grande importância como fontes promissoras de um grande número de produtos biologicamente ativos, dentre eles os polissacarídeos. Alguns destes microrganismos marinhos vivem em ambientes com alta pressão, alto teor salino, baixa temperatura e

oligotróficos, proporcionando a produção de substâncias ativas únicas. Dessa forma, polissacarídeos microbianos marinhos, especialmente os polissacarídeos extracelulares, têm uma ampla diversidade estrutural, muito complexa e particular (WANG, WANG e GUAN, 2012).

A maioria dos polissacarídeos encontrados nos microrganismos marinhos são heteropolissacarídeos, sendo os monossacarídeos mais comuns a glucose, a galactose e a manose, podendo ainda apresentar em sua estrutura grupos sulfato. Essas macromoléculas apresentam uma ampla composição química e característica estrutural pouco estudada, tornando-se alvo de pesquisas para potenciais aplicações nos campos de produtos farmacêuticos, aditivos alimentares e tratamento de resíduos industriais (RAPOSO, DE MORAIS e DE MORAIS, 2013).

### **1.2.3 Atividades Biológicas.**

#### *1.2.3.1 Atividade anticoagulante.*

- Cascata de Coagulação Sanguínea.

A formação do coágulo de fibrina no sítio de lesão endotelial representa um processo para a manutenção da integridade vascular. Os mecanismos envolvidos nesse processo, constituintes do sistema hemostático, devem ser regulados para, simultaneamente, contrapor-se à perda excessiva de sangue e evitar a formação de trombos intravasculares, decorrentes de formação excessiva de fibrina (FRANCO, 2001).

Em 1964, dois grupos independentes propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação sanguínea (MACFARLANE, 1964; DAVIE e RATNOFF, 1964). Nesse modelo a coagulação sanguínea fisiológica pode ser iniciada por meio de duas cascatas convergentes: a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 2).

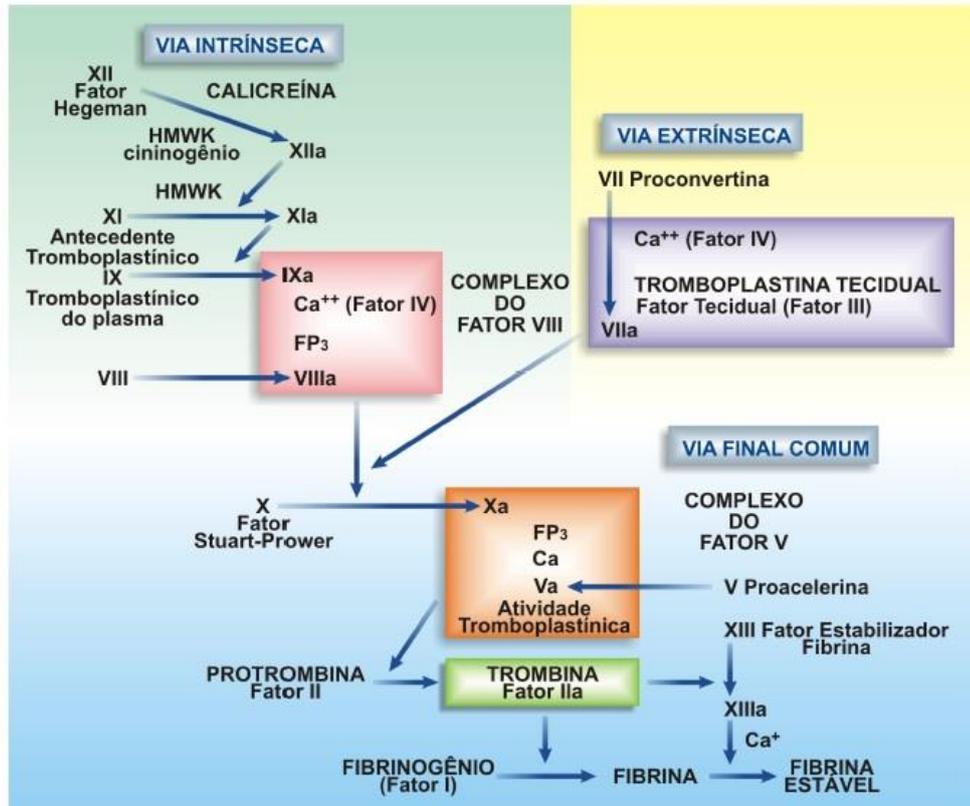


FIGURA 3. Cascata de coagulação sanguínea. FONTE: Rodrigues *et al.*, 2012.

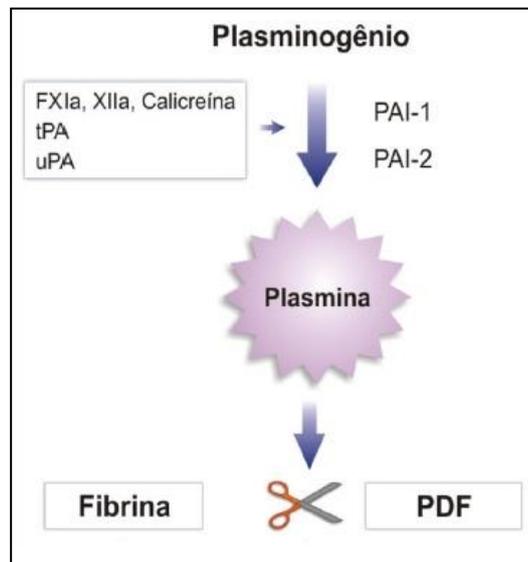
A via extrínseca é desencadeada quando o fator VII circulante (FVII) se liga ao seu receptor de membrana, fator tecidual (TF), expresso em células subendoteliais expostas ao sangue quando a vasculatura normal é interrompida. Uma vez ligado a TF, FVII é autoclivado para formar FVIIa. O complexo FVIIa-TF então cliva o fator X (FX) na sua forma ativa (FXa). FXa é comum às vias de coagulação extrínseca e intrínseca. FXa associa-se com o fator V (FV) para formar protrombinase (FXa-FVa), que converte protrombina em trombina. A trombina, por sua vez, cliva o fibrinogênio para formar fibrina, iniciando a formação do coágulo (COLMAN, 2006).

Na via intrínseca todos os componentes estão presentes na circulação sanguínea e se inicia após a interação do fator XII (FXII) com a superfície negativa do endotélio lesado. A molécula do cininogênio de alto peso molecular (CAPM) atua como cofator do fator XII ativado (FXIIa), que converte a pró-enzima precalicreína (PC) em calicreína. Em seguida, a calicreína acelera a conversão do FXII em FXIIa, que se autoativa por *feedback* positivo. O FXIIa converte o fator XI (FXI) inativo à sua forma ativa. O FXIa se comporta como uma serino-protease e ativa o substrato fator IX (FIX). O FIXa juntamente com o FVIIIa (ativado pela trombina), fosfolípidios carregados

negativamente (principais constituintes da membrana celular) e íons cálcio (sintetizados por plaquetas ativadas) formam o complexo tenase intrínseco e cliva o FX tornando-o ativo, logo, promovendo a produção de trombina e formação de coágulos (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Depois que uma rede de fibras de fibrina é formada um conjunto de inibidores é responsável por desativar a cascata de coagulação, entre eles estão os inibidores da trombina, a antitrombina III e o cofator II da heparina (ZAVYALOVA e KOPYLOV 2016).

Além disso, quando o coágulo sanguíneo não é mais necessário para a hemostase, o sistema fibrinolítico dissolve o coágulo e restaura o vaso sanguíneo (Figura 4). Nesse sistema o plasminogênio, uma proenzima inativa, é convertida em plasmina ativa por dois ativadores diferentes, o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e do tipo uroquinase (u-PA). Ambas proteínas de ativação do plasminogênio são reguladas, principalmente, pelo inibidor do ativador de plasminogênio tipo I (PAI-1). A plasmina ativa degrada o componente de fibrina do coágulo em produtos de degradação solúveis (PDF) (FÉLÉTOU, 2011). Assim, cerca de 15% da plasmina circulante é gerada via proteínas pró-coagulante: Caliceína e FXIa, que ativam diretamente o plasminogênio (RODRIGUES *et al.*, 2012).

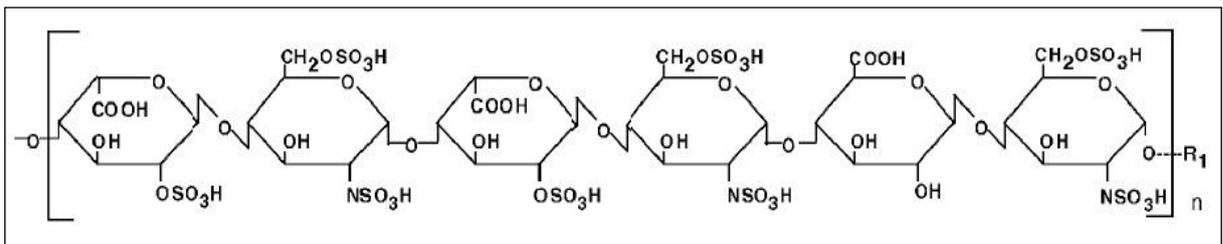


**FIGURA 4. Sistema fibrinolítico.** Fonte: adaptado de Rodrigues *et al.*, 2012.

- Polissacarídeos sulfatados como anticoagulantes.

Os anticoagulantes são o principal grupo de fármacos utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares, sendo o GAG heparina o mais utilizado na terapia para este grupo de doenças (DE CATERINA *et al.*, 2013).

A estrutura básica da heparina é um hexassacarídeo octassulfatado constituída essencialmente por dois dissacarídeos, um trissulfatado e outro dissulfatado. O primeiro dissacarídeo é formado por  $\alpha$ -D-glucosamina, N-6-dissulfatada, unida por ligação  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) ao ácido  $\alpha$ -L-idurônico 2,O-sulfatado, e o outro apresenta  $\alpha$ -D-glucosamina, N-6-dissulfatada, unida ao ácido  $\beta$ -D-Glucurônico por ligação  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 5), podendo ocorrer pequenas variações em heparinas de origens diferentes (SILVA e DIETRICH, 1975).



**FIGURA 5. Estrutura hexassacarídica básica da heparina.** FONTE: adaptado NADER *et al.*, 2001.

A heparina possui diversos mecanismos de ação que favorecem sua atividade anticoagulante. O principal mecanismo de sua ação reside na sua capacidade em formar um complexo ternário com antitrombina III e com o cofator de heparina II, potencializando a afinidade desses inibidores pela trombina. Além disso, a heparina aumenta a síntese e liberação do inibidor da via do fator tecidual pelas células endoteliais (NADER *et al.*, 2001).

Alguns efeitos colaterais têm sido observados com o uso clínico contínuo de heparina, como efeitos anticoagulantes variáveis, incapacidade de inibir trombina ligada ao coágulo e ocorrência de trombocitopenia em alguns pacientes. Assim, a busca por novos compostos anticoagulantes tem se intensificado, sendo os polissacarídeos sulfatados os principais alvos (NADER *et al.*, 2001).

Atualmente, dentre as atividades farmacológicas atribuídas aos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, a atividade anticoagulante é a mais relatada. Dois tipos de polissacarídeos são identificados com alta atividade anticoagulante, as carragenanas de algas vermelhas e fucoidans de algas marrons. No entanto, há

poucos relatos para os polissacarídeos sulfatados de algas verdes. A atividade anticoagulante relatada para os polissacarídeos sulfatados de algas está diretamente relacionada à sua estrutura – massa molecular, resíduos de monossacarídeos e o grau e localização de sulfatação (WIJESEKARA, PANGESTUTI e KIM, 2011; NGO e KIM, 2013).

A atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados tem sido determinada principalmente por ensaios de Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), que avalia a inibição de fatores da via intrínseca da cascata de coagulação; Tempo de Protrombina (TP), que avalia os fatores da via extrínseca; e Tempo de Trombina (TT), que avalia a inibição da trombina (NGO e KIM, 2013).

As carragenanas sintetizadas pelas algas vermelhas têm como característica estrutural essencial a presença de unidades dissacarídicas formadas por (1-3)- $\beta$ -galactose-(1-4)- $\alpha$ -galactose, podendo ser substituídas por sulfato em várias posições. Além disso, resíduos de  $\alpha$ -galactose podem ser substituídos por 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose. A quantidade e as posições dos grupos sulfato, bem como, a presença ou não da anidro-galactose permitem classificar as carragenanas em: *k*-carragenana, composta por resíduos de  $\beta$ -D-galactose sulfatados na posição C-4 e por unidades de anidro-galactose; *ι*-carragenana que possui um grupo sulfato adicional na posição C-2 do resíduo de anidro-galactose; e *λ*-carragenana que não possui resíduos de anidro-galactose, no entanto, possui três grupos sulfato por unidade dissacarídica, sendo a terceira sulfatação na posição C-6 (LAHAYE, 2001; ESTEVEZ, CIANCIA e CERESO, 2000; ZHOU *et al.*, 2004; FUNAMI *et al.*, 2007). Silva *et al.* (2010) demonstrou a atividade anticoagulante das carragenanas (*k*, *ι* e *λ*) por meio da inibição da trombina (diminuição do TP). Além disso, eles observaram que o TTPa para a *λ*-carragenina foi superior as carrageninas *k* e *ι*, sugerindo a importância do grau de sulfatação na atividade anticoagulante.

As fucanas presentes em algas marrons são polissacarídeos sulfatados ricos em fucose podendo ser classificadas em homofucanas ou heterofucanas. Sua estrutura varia de acordo com as espécies das algas e o procedimento de extração. Embora vários estudos tenham tentado determinar a característica principal das fucanas, apenas alguns exemplos de regularidade foram encontrados. Segundo Dore *et al.* (2013) as ligações, ramificações, posições de sulfato e composição dos monossacarídeos diferem significativamente. As fucanas obtidas da alga *Padina gymnospora* por Silva *et al.* (2005), purificadas por cromatografia de gel filtração,

apresentaram como unidade principal ácido 3- $\beta$ -D-glucurônico 1  $\rightarrow$  ou ácido 4- $\beta$ -D-glucurônico 1  $\rightarrow$  substituído no C-2 da  $\alpha$ -L-fucose ou  $\beta$ -D-xilose. Os grupos sulfato só foram detectados nas unidades C-3 de 4- $\alpha$ -L-fucose 1  $\rightarrow$ . A heterofucana apresentou atividade anticoagulante estimado por TTPa, a qual não foi mais observada quando os polissacarídeos foram dessulfatados, indicando que a 3-O-sulfatação em C-3 de 4- $\alpha$ -L-fucose 1  $\rightarrow$  possa ser responsável pela atividade anticoagulante do polímero.

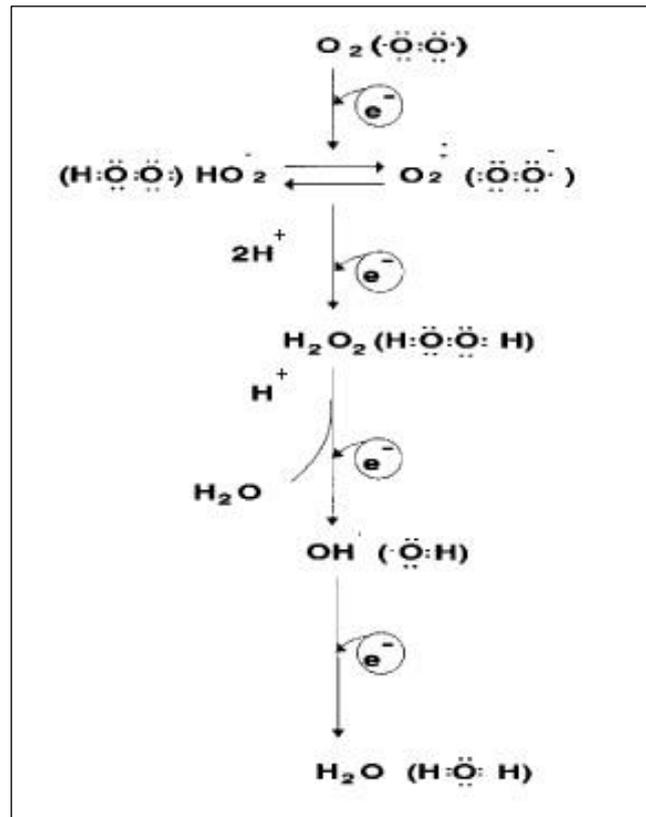
### 1.2.3.2 Atividade antioxidante.

- Espécies reativas de oxigênio (ROS).

O termo radical livre é utilizado para designar qualquer espécie química (átomo, íon ou molécula) que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, conferindo alta reatividade aos radicais, de modo que, reajam tão logo sejam formados (WICKENS, 2001; COSTA *et al.*, 2012).

Os radicais livres são oriundos do metabolismo celular que, em excesso, atacam macromoléculas como: o DNA, modificando suas bases nitrogenadas e caso não haja reparo, pode ocasionar mutações; as proteínas, ao oxidar os grupos sulfidrilas (-SH) alterando sua conformação e, conseqüentemente, sua função; por fim, podem ainda reagir com lipídeos de membranas celulares alterando, novamente, a estrutura e função da biomolécula (VALKO *et al.*, 2007; SOSA *et al.*, 2013). Devido a alta reatividade, os radicais livres estão relacionados, direta ou indiretamente, a lesões teciduais e, conseqüentemente, vários distúrbios na saúde como: câncer, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas, inflamatórias, cardiovasculares e aterosclerose (SHEN *et al.*, 2014).

A fonte mais comum de radicais livres em organismos aeróbios é o oxigênio, sendo as espécies formadas denominadas de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS são formadas no metabolismo mitocondrial durante a formação da água (H<sub>2</sub>O) a partir do oxigênio (O<sub>2</sub>), onde moléculas intermediárias reativas são formadas, como mostrado na Figura 6. As principais espécies reativas do oxigênio são: o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical hidroxila (HO<sup>-</sup>) (KOHEN e NYSKA, 2002). Porém, existem as espécies reativas de nitrogênio (RNS) formadas durante ativação de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, e espécies reativas de enxofre (RSS) e cloro (RCS) oriundas do metabolismo celular (SOSA *et al.*, 2013).



**FIGURA 6. Formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir da formação da H<sub>2</sub>O.**  
 FONTE: FERREIRA e MATSUBARA, 1997.

A ação prejudicial dos ROS pode ser minimizada por substâncias antioxidantes naturais do organismo ou externas, provenientes da alimentação, apresentando ação enzimática (superóxido desmutase, catalase, e glutadiona peroxidase) ou, ação não-enzimática (vitamina A, vitamina C, vitamina E, glutadiona, dentre outros). Dessa forma, essas substâncias antioxidantes podem agir bloqueando diretamente ROS ou prevenindo sua síntese (VALKO *et al.*, 2006; LI e ZHOU, 2007; CHEN *et al.*, 2010).

- Polissacarídeos sulfatados como antioxidantes.

Muitos compostos vêm sendo apontados como excelentes antioxidantes tais como, vitaminas, flavonoides e carotenoides, e os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, incluindo microalgas, tem ganhado destaque. Esses polímeros têm demonstrado potencial efeito antioxidante em testes que avaliam desde a capacidade de sequestrar radicais livres, quelar íons metálicos até a capacidade de reduzir ou inibir a oxidação de compostos lipídicos. Os mecanismos de ação ainda não estão claros, mas acredita-se que a ampla variedade estrutural dos polissacarídeos

sulfatados esteja relacionada a essa diversidade de mecanismos de ação (COSTA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014; SUN, *et al.*, 2014; BURG e OSHRAT, 2015).

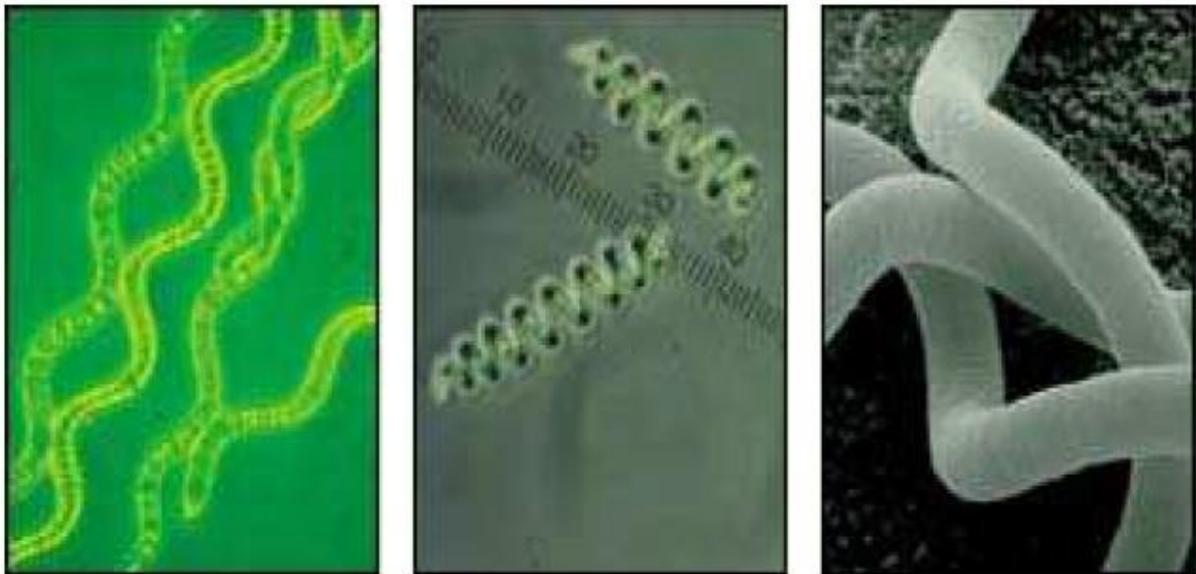
Zhang *et al.* (2009) apresentou a atividade antioxidante por ação na eliminação dos radicais  $O_2$ ,  $HO\cdot$  e radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) do porfiram, um polissacarídeo sulfatado rico em anidro-galactose extraído da alga vermelha *Porphyra haitanensis*. Além disso, mostrou que o porfiram de baixo peso molecular e seus derivados sulfatados, acetilados, fosforilados e benzoilados apresentaram aumento na atividade antioxidante do porfiram de maior peso.

Heterofucanas extraídas da alga marrom *Sargassum vulgare* compostas de fucose, galactose, xilose, ácido Glucurônico e manose apresentou atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH. Após purificação em cromatografia de exclusão de tamanho em *Sephrose CL-4B* foi observado uma diminuição no teor de sulfato e na atividade antioxidante das heterofucanas (DORE *et al.*, 2013).

Dessa forma, polissacarídeos de macro e microalgas têm se tornado alvo na busca de antioxidantes naturais para desenvolver novos produtos para a indústria alimentícia e nutracêutica.

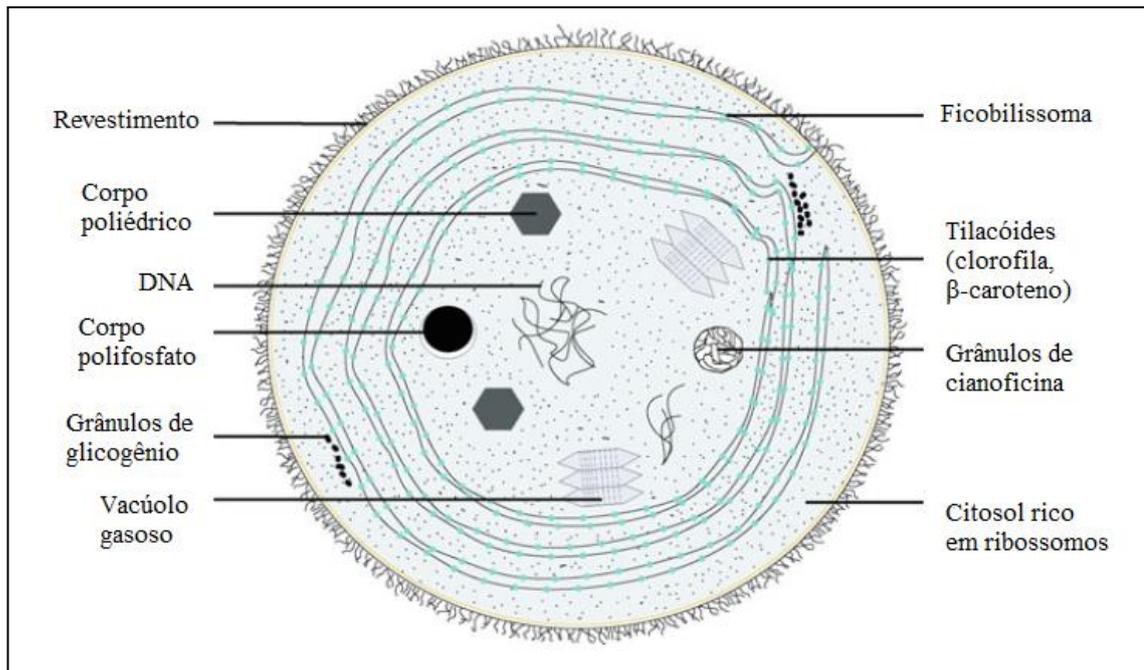
#### **1.2.4 *Spirulina sp***

*Spirulina sp* (também denominada *Arthrospira sp*) pertence ao grupo das cianobactérias ou algas verde-azuladas. São microalgas unicelulares que se agrupam para formar filamentos (também conhecidos como tricomas), geralmente, em espiral (Figura 7). O comprimento e diâmetro dos filamentos contendo as células de *Spirulina*, assim como a dimensão celular, variam de acordo com a espécie (SOTIROUDIS e SOTIROUDIS, 2013). O gênero *Spirulina* consiste em 15 espécies conhecidas, dentre as quais as mais comuns são a *Spirulina platensis* (*A. platensis*) e *Spirulina maxima* (*A. maxima*). Sendo a *Spirulina platensis* mais estudada em diferentes áreas, especialmente na área alimentícia e médica (HOSEINI, KHOSRAVI-DARANI e MOZAFARI, 2013).



**Figura 7. Filamento *Spirulina sp.*** Células se agrupam formando os filamentos em espiral da *Spirulina sp.* Fonte: DE MORAIS, 2015.

A cianobactéria *Spirulina* ocupa uma posição intermediária entre as bactérias fotossintetizantes e as algas eucarióticas. Não possuem bacterioclorofila, porém contêm clorofila e outros pigmentos, responsáveis pela fotossíntese de maneira análoga as plantas superiores. Sua estrutura procariótica, parede celular, ribossomos e ácido nucléico (uma molécula central de DNA), classificam-na dentro do grupo das bactérias, especificamente, das bactérias gram-negativas, devido às características da parede celular que são semelhantes, composta principalmente de peptidoglicano e lipopolissacarídeo (Figura 8) (CARVAJAL, 2009; SOTIROUDIS e SOTIROUDIS, 2013).



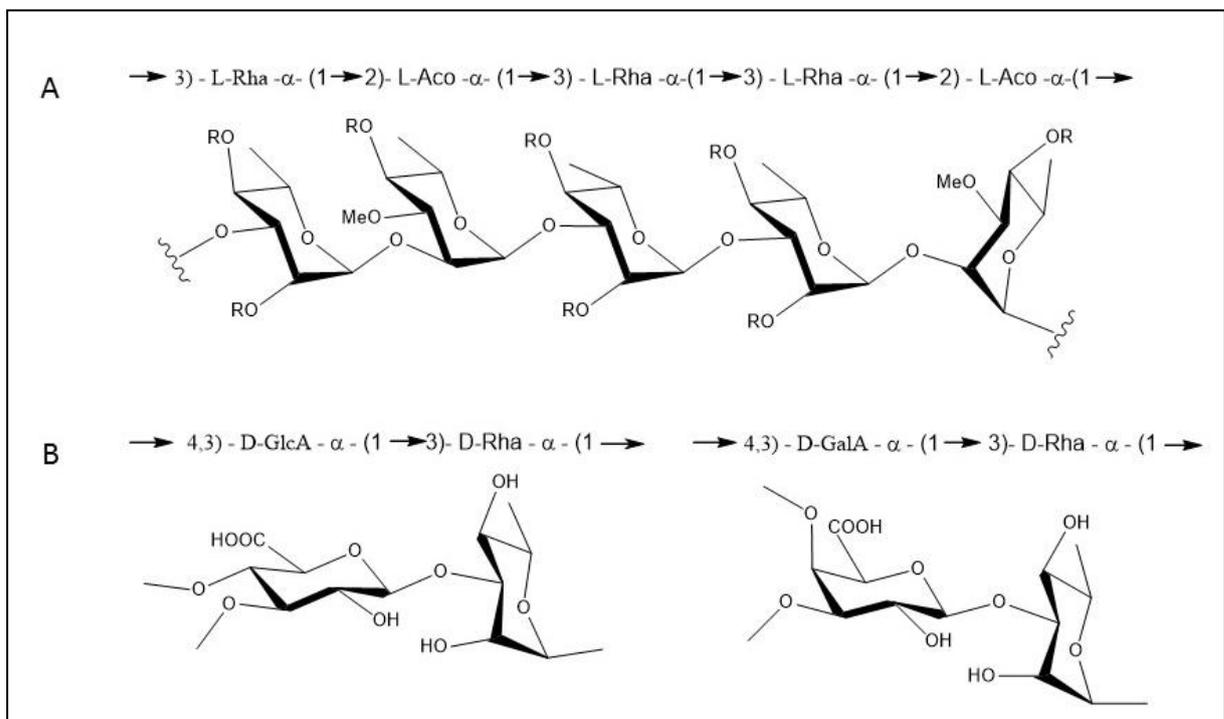
**Figura 8. Morfologia celular de cianobactéria.** Fonte: Pignolet *et al.*, 2013.

A *Spirulina* é composta principalmente por proteínas, polissacarídeos e lipídios, porém metabólitos secundários tais como, vitaminas, pigmentos e compostos fenólicos também estão presentes. Esses compostos reagem a alterações do ambiente externo, variando sua síntese e composição química. Assim, a manipulação das condições de cultura, a presença ou ausência de certos nutrientes, estimula a biossíntese de compostos específicos (DE MORAIS, 2015)).

Os polissacarídeos da *Spirulina* podem ser classificados em três principais grupos de acordo com sua localização na célula: (1) polissacarídeos citosólicos, que fornecem uma fonte de carbono e energia para a célula; (2) polissacarídeos que compõem a parede celular, incluindo peptidoglicanos e lipopolissacarídeos; e (3) polissacarídeos que são liberados para o meio extracelular, sob a forma de cápsulas ou revestimento, conhecido como exopolissacarídeos (PANIAGUA-MICHEL, OLMOS-SOTO e MORALES-GUERRERO, 2014). Esses polissacarídeos, especialmente os de parede celular e extracelulares, apresentam grande diversidade, complexidade e particularidades em sua estrutura. A maioria são heteropolissacarídeos, compostos por diferentes monossacarídeos, em que a glucose, galactose e manose são os componentes mais comuns. Além disso, podem conter em sua composição ácido glucurônico, ácido galacturônico, açúcares aminados, sulfatados e piruvato (WANG, WANG e GUAN, 2012).

Spirulam (H-SP) é um polissacarídeo sulfatado isolado do extrato aquoso, a quente, da *Spirulina platensis* muito estudado quanto a sua estrutura e atividades biológicas. Spirulam apresenta peso molecular estimado em torno de 260 a 310 KDa e é composto por ramnose, 3-O-metilramnose (acofriose), 2,3-di-O-metilramnose, 3-O-metilxilose, e traços de outros monossacarídeos (manose, Glucose, ribose, arabinose e fucose). Além disso, ácidos urônicos (ácido glucurônico e galacturônico) e sulfato também estão presentes (LEE *et al.*, 1998, LEE *et al.*, 2000).

A cadeia principal do spirulam consiste de ramnose  $\alpha$ -1,3-ligada e 3-O-metilramnose  $\alpha$ -1,2-ligada, os grupos sulfato estão substituídos na posição C-2 ou C-4 da  $\alpha$ -1,3-ramnose e na posição C-4 da acofriose (Figura 9). O polímero tem terminação não redutora formada por 2,3-di-O-metilramnose e resíduos de 3-O-metilxilose. O spirulam pode quelar íons formando sais como: cálcio-spirulam (Ca-SP) ou sódio-spirulam (Na-SP) (LEE *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2000; YAMAMOTO, FUJIWARA e KAJI, 2006). No entanto, suas características estruturais detalhadas, incluindo a sequência de monossacarídeos, ainda permanece incertas (LEE *et al.*, 2000).



**FIGURA 9. Spirulam (H-SP).** Oligossacarídeos derivados de Na-SP após hidrólise ácida. A: fração neutra de oligossacarídeos; B: fração ácida de oligossacarídeos. R= H ou SO<sub>3</sub>H. FONTE: adaptada de Yamamoto, Fujiwara e Kaji, 2006.

Segundo Lee *et al.* (1998) os açúcares O-metilados presentes no spirulam contribuem para o carácter lipofílico do polímero e os grupos sulfato para o hidrofílico, fornecendo propriedades anfipáticas ao polissacarídeo. Além disso, a partir de estudos com esse polissacarídeo, tem-se demonstrado que o grupamento sulfato é de grande importância para a o desempenho de suas atividades biológicas.

Outros polissacarídeos da *Spirulina sp* têm sido analisados quanto a composição monossacarídica, composição química e atividade biológica, porém pouco se discuti sobre estrutura química. Como em Chaiklahan *et al.* (2013) que relatou a atividade antioxidante, por sequestro do radical DPPH, do extrato de polissacarídeos obtido de *Spirulina sp* rico em ramnose e com quantidades menores de Glucose e ribose e, traços de galactose, xilose e manose. Pugh *et al.* (2001) também obteve um polissacarídeo com atividade imunoestimuladora rico em ramnose e com peso molecular estimado próximo a 10000 KDa, bem diferentes do spirulam.

Dessa forma, a rica composição química da *Spirulina sp* fornece potenciais efeitos a saúde humana ou animal, incluindo imunomodulação, atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e antibacteriana, bem como efeitos positivos contra a má nutrição, hiperlipidemia, obesidade, diabetes, reações alérgicas inflamatórias e anemia. Devido a tantos efeitos benéficos a saúde, a *Food and Drug Administration of the United States of America* incluiu a *Spirulina* no grupo dos produtos seguros - *Generally Recognized As Safe* (GRAS) - sendo atualmente regulada por tal órgão como alimento e suplemento dietético (PARAGES *et al.*, 2012; HOSEINI, KHOSRAVI-DARANI e MOZAFARI, 2013; DE MORAES, 2015).

#### 1.2.4.1 Atividade antioxidante da *Spirulina sp*.

Chaiklahan *et al.* (2013) analisando extratos aquosos de polissacarídeos sulfatados de *Spirulina*, observou maior atividade antioxidante para o extrato com maior conteúdo de fenólicos. Uma vez que esse extrato obtido por estes autores, não foi submetido a processos de purificação, não se pode afirmar se efeito antioxidante observado ocorre pela presença dos polissacarídeos, dos compostos fenólicos, ou de ambos.

Baky, Baz e Latife (2013) demonstraram a atividade antioxidante de extratos, aquoso e etanólico, de polissacarídeos sulfatados de *S. platensis*. Novamente nenhum processo de isolamento foi realizado, entretanto os autores defendem que a

atividade antioxidante seja devido aos grupos -OH e -OSO<sub>3</sub>H do polissacarídeo, porém essa atividade pode estar relacionada a outros compostos bioativos que possam estar presentes no extrato.

Romay *et al.* (1998) descreveram que a ficocianina purificada de *S maxima* age no bloqueio de ROS (OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e RO<sup>-</sup>) e na ação de enzimas envolvidas na produção de ROS, como a mieloperoxidase e Glucose oxidase. Assim, extratos de polissacarídeos testados para atividade antioxidante, que contenham resquícios desse pigmento protéico pode apresentar um contaminante bioativo em potencial, a ficocianina.

#### 1.2.4.2 Atividade anticoagulante da *Spirulina sp.*

A regulação da coagulação sanguínea e do sistema fibrinolítico está diretamente relacionada com as células do endotélio vascular já que elas sintetizam e secretam não apenas proteínas fibrinolíticas, mas também substâncias anticoagulantes, como proteoGlcans, mantendo a hemostase sanguínea. Os proteoGlcans secretados pelas células endoteliais, predominantemente, são o perlecam (proteoGlcano de heparam sulfato) e o biGlcam (proteoGlcano de dermatam sulfato/condroitim sulfato). Perlecam e biGlcam exibem atividade anticoagulante pela ativação da antitrombina III e cofator II da heparina, respectivamente, inibidores fisiológicos da trombina (MERTENS *et al.*, 1992; WHINNA *et al.*, 1993). Segundo Yamamoto *et al.* (2005) Na-SP exibe atividade anticoagulante por meio da modulação das funções das células do endotélio vascular, uma que este composto leva a um aumento da secreção endotelial de ambos proteoGlcans, perlecam e biGlcam.

Na-SP também estimulou a atividade fibrinolítica nas células endoteliais vasculares, *in vitro*, por meio do aumento da secreção de proteínas fibrinolíticas, a u-PA e PAI-1. O mecanismo para atividade fibrinolítica ainda é desconhecido, mas sabe-se que o spirulam dessulfatado não teve efeito algum, sugerindo a importância da estrutura para a atividade anticoagulante (YAMAMOTO *et al.*, 2003).

Segundo Baky, Baz e Latife (2013) extratos aquosos e etanólicos de *S. platensis* exibiram atividade anticoagulante ao quelarem os íons cálcio evitando a formação do coágulo. A atividade anticoagulante foi proporcional a característica aniônica dos polissacarídeos presentes nos extratos, sugerindo que a presença de ácido urônico e grupos sulfato sejam os responsáveis por quelarem o íon Ca<sup>2+</sup>. Além

disso, os autores sugeriram que a propriedade anticoagulante possa ser atribuída à inibição direta da atividade da trombina mediada pelo cofator II da heparina.

Dessa forma, as atividades aqui mencionadas são dependentes da composição do polissacarídeo, densidade de carga negativa, grau e posição de grupos sulfato, peso molecular e, conseqüentemente, conformação estrutural do polissacarídeo.

#### 1.2.4.3 Outras atividades descritas para *Spirulina sp.*

Outras atividades biológicas têm sido relatadas para *Spirulina sp.*, como a atividade antitumoral. Grawish (2008) demonstrou um efeito supressor no tumor da mucosa de bochecha de hamsters a um extrato de *S. platensis* devido o reparo da molécula de DNA danificado a partir do estímulo de endonucleases. Enquanto, Oh *et al.* (2011) relataram efeito antitumoral de seus extratos aquosos de *Spirulina maxima* por meio do estímulo a apoptose de células tumorais.

Estudos também mostram que a *Spirulina sp.* apresenta atividade antiviral. De acordo com Rechter *et al.* (2006) dois extratos de *S. platensis* (um intracelular - rico em carboidrato e outro, o extracelular - carboidrato com níveis significativos de proteína) mostraram inibir a replicação, *in vitro*, de vírus humano: citomegalovírus, vírus herpes simplex, herpes vírus humano tipo 6 e o vírus da imunodeficiência humana tipo 1. Já Hayashi e Hayashi (1996) demonstraram que Ca-SP é um potente inibidor da replicação de vírus envelopados, tais como vírus herpes simplex tipo 1 e vírus da imunodeficiência humana tipo 1 por meio da inibição da adsorção e fusão dos vírus nas células hospedeiras e, após dessulfatação e remoção do íon cálcio essa atividade é reduzida.

Atividade imunomoduladora também já foi relatada. Polissacarídeos sulfatados de *S. platensis* mostraram ter atividade pró-inflamatória, *in vitro*, ao aumentar a produção da citocina TNF- $\alpha$  em macrófagos RAW (PARAGES *et al.*, 2012). Em outro estudo, voluntários humanos saudáveis receberam por via oral um extrato aquoso de *S. platensis* e apresentaram aumento na secreção de IFN- $\gamma$  produzida por células naturais *killer* (NK), coletadas por punção venosa dos voluntários (HIRAHASHI *et al.*, 2002).

Além das atividades mencionadas, o efeito hepatoprotetor também já foi relatado para *Spirulina sp.* Carotenóides extraídos de *S. platensis* reduziram os marcadores transaminases e fosfatase alcalina de ratos Wistar com danos hepáticos

induzidos por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (MURTHY et al., 2005). Yoshinari, Shiojima e Igarashi (2014) demonstraram que a *Spirulina* foi capaz de suprimir o aumento de marcadores inflamatórios (IFN $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e hepáticos (ALT e AST) e, diminuir enzimas e substratos envolvidos no processo oxidativo do fígado lesado (catalase, glutaciona-peroxidase e glutaciona oxidada) de ratos com lesão hepática.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Extração e caracterização de polissacarídeos da biomassa seca comercial *Spirulina sp* e análise das atividades anticoagulante e antioxidante *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração de polissacarídeos em diferentes condições - Extração alcalina, proteólise seguida de precipitação com diferentes solventes orgânicos, proteólise com diferentes enzimas proteolíticas e lise celular acompanhada de proteólise com papaína;
- Purificação dos polissacarídeos extraídos por cromatografia de troca iônica em resina *Q-Sepharose*;
- Modificação química dos polissacarídeos sulfatados por  $\beta$ -eliminação e dessulfatação;
- Caracterização química dos polissacarídeos obtidos por dosagens químicas (Dosagem de açúcar total, sulfato, ácido urônico, proteínas e fenólicos)
- Caracterização físico-química dos polissacarídeos extraídos por cromatografia em papel, cromatografia de gel filtração e eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida;
- Caracterização espectroscópica dos polissacarídeos sulfatados obtidos por RAMAN, Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear  $^{13}\text{C}$ ;
- Analisar a atividade anticoagulante *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados pelo método USP;
- Analisar a atividade antioxidante *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados pelos métodos de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS.

#### 3.1 MATERIAIS.

##### 3.1.1 Material de estudo.



**Figura 10.** Filamento em espiral da *Spirulina sp.* Imagens de microscopias. Fonte: CARVAJAL, 2009.

Reino: Bacteria

Filo: Cyanobacteria

Classe: Cyanophyceae

Ordem: Oscillatoriales

Espécies: *Spirulina maxima* (*Arthrospira maxima*)

*Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*)

A biomassa seca da espécie *Spirulina sp* (Galena Química e Farmacêutica Ltda, Campinas, SP, Brasil - lote de fabricação 2014007 – China) foi obtida na Farmácia de Manipulação Las Casas/Juiz de Fora – MG. O laudo do fornecedor indicou que a biomassa seca se tratava de uma mistura das espécies *S. maxima* e *S. platensis*. Até o momento de uso a biomassa da microalga foi armazenada à temperatura ambiente.

### 3.1.2 Reagentes.

#### 3.1.2.1 *Enzimas.*

- Papaína PA (PROQUÍMIOS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em tampão fosfato-cisteína 0,05 M pH 6,5. (1,8 g cisteína-HCl (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA), 7,4 g EDTA sal dissódico (Êxodo Científica, Hortolândia, SP, Brasil), 15,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 3,54 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) em 1 L de água destilada).
- ALCALASE® (*Bacillus licheniformis*) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 9,0 (6,06 g Tris (2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol) (Biosolve, Valkenswaard, Holanda) e ácido clorídrico (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) suficiente para ajustar pH em 9,0 em 1 L de água destilada).

#### 3.1.2.2 *Eletroforese.*

*Eletroforese em gel de agarose (0,5%) tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA).*

- Agarose obtida da Bio-Rad Laboratories Inc. (Richmond, CA, EUA) foi dissolvida em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) 0,05 M, pH 9,0 (43 mL 1,3-diaminopropano (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), 35-40 mL ácido acético (LABSYNTH, Diadema, SP, Brasil), até pH 9,0, em 1 L de água destilada).
- Brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) da Merck (Darmstadt, Alemanha) 1 g CETAVLON em 1 L de água destilada
- 100 mg de azul de toluidina (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) em solução 1% de ácido acético (LABSYNTH, Diadema, SP, Brasil) e 50% de etanol PA (PROQUÍMIOS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em água destilada (100 mL);
- Benzina adquirida da ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

*Eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE).*

- Agarose obtida da Bio-Rad Laboratories Inc (Richmond, CA, EUA) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE), pH 8,3 (12,11 g Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) (Biosolve, Valkenswaard, Holanda), 6,18 g ácido bórico PA (Dinâmica Química, Diadema, SP, Brasil) e 0,34 g EDTA sal dissódico (Êxodo Científica, Hortolândia, SP, Brasil) em 1L de água destilada);
- 200 mg de azul de bromofenol (PROQUÍMIOS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em solução 40 % de Glicerina (Cromato Produtos Químicos Ltda, Diadema, SP, Brasil) em tampão TBE (100 mL);
- 100 mg de azul de toluidina (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) em solução 1% de ácido acético (LABSYNTH, Diadema, SP, Brasil) em água destilada (100 mL).

*Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE)*

- Cianoborohidreto de sódio e 2-aminoacridona (AMAC) foram adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).
- *Resolving gel:* 70 µL persulfato de amônio (APS) (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil), 7 µL *N,N,N',N'*- tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), 6,25 mL solução de acrilamida/ bisacrilamida (19 g acrilamida (Ludwig Biotecnologia Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) e 1 g bisacrilamida (Neon Comercial Ltda., São Paulo, SP, Brasil) em 30 mL de água destilada), 2,50 mL tampão Tris-borato pH 7,0 (4,54 g Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) (Biosolve, Valkenswaard, Holanda), 1,55 g ácido bórico (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil) em 30 mL de água destilada) e 1,25 mL de água destilada.
- *Stacking gel:* 50 µL persulfato de amônio (APS) (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil), 10 µL *N,N,N',N'*- tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), 2,20 mL solução de acrilamida/ bisacrilamida (4,88 g acrilamida (Ludwig Biotecnologia Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) e 0,13 g bisacrilamida (Neon Comercial Ltda., São Paulo,

SP, Brasil) em 30 mL de água destilada), 1,0 mL tampão Tris-borato pH 6,8 (3,03 g Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) (Biosolve, Valkenswaard, Holanda), 1,55 g ácido bórico (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil) em 30 mL de água destilada) e 1,25 mL de água destilada.

- Tampão de corrida (Tris-Glcina-borato) pH 8,3 (12,54 g Tris (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) (Biosolve, Valkenswaard, Holanda), 6,19 g ácido bórico (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil) e 7,51 g Glcina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA).

### 3.1.2.3 *Monossacarídeos padrões.*

Os seguintes monossacarídeos padrões foram utilizados: xilose, ramnose, manose, glucose, galactose, ácido glucurônico e ácido galacturônico, todos obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

### 3.1.2.4 *Glicosaminoglicanos padrões.*

Os GlicosaminoGlicanos padrões, condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato e dermatam sulfato, foram todos obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). O heparam sulfato de pulmão bovino, foi purificado como descrito por Dietrich e Nader (1974). A heparina (165 UI) foi adquirida da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

### 3.1.2.5 *Demais padrões utilizados.*

Os polissacarídeos padrões, dextram sulfato (8 KDa) e dextram (60-90 KDa e 100-200 KDa), assim como os padrões de quercetina e ácido ascórbico foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

O padrão de albumina bovina foi obtido pela INLAB Confiança (Diadema, SP, Brasil) e o sulfato de sódio da LABIMPEX Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda (Diadema, SP, Brasil).

### 3.1.2.6 Resinas Cromatográficas.

Resina *Q-Sepharose Fast Flow* foi adquirida da GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suécia) e a *Sephadex G-200* da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

### 3.1.2.7 Reagentes químicos de uso geral.

Além das drogas e reagentes de grau analítico foram utilizados:

- Ácido isobutílico, ácido sulfúrico e *coomassie G-250*, todos obtidos da Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Ácido tricloroacético e n-hexano da LABSYNTH produtos para laboratório Ltda (Diadema, SP, Brasil);
- Ácido fênico da ALPHATEC (São José dos Pinhais, PR, Brasil);
- Carbazol, tetraborato de sódio, tween 40, ácido linoleico,  $\beta$ -caroteno e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Diclorometano e dimetilsulfóxido da ISOFAR Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Gelatina Difco obtido da Interlab Distribuidora de Produtos Científicos (São Paulo, SP, Brasil);

### 3.1.3 Equipamentos.

Além dos equipamentos de uso comum do laboratório foram utilizados:

- Desruptor de Células Ultra-sônico da UNIQUE Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos Ltda (Indaiatuba, SP, Brasil);
- Câmara de eletroforese em gel de agarose horizontal, modelo desenvolvido por Jaques *et al.* (1968), foi adquirido da técnica Permatron Ltda. (Joinville, SC, Brasil);
- Cuba de eletroforese horizontal DIGEL da Dongfang Equipment CO Ltd. (China, República Popular);
- Fonte de corrente contínua regulável *Electrophoresis Power Supply Model 494* da *Instrumentation Specialties Company* (USA);

- Sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell da Bio-Rad Laboratories Inc. (Richmond, CA, EUA);
- Cuba para cromatografia em papel da General Glassblowing Company, Inc. (Richmond, CA, EUA);
- Sistema de aquisição de imagem GelDoc-It Imaging System e Câmara Scientific Grade CCD GelCam 310, obtidos da UVP (Upland, California, EUA) pertencente ao Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora;
- Espectrofotômetro SP-22, Biospectro (Curitiba, PR, Brasil);
- Espectrofotômetro Multiskan GO, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA);
- Espectrômetro Bruker RFS 100 pertencente ao Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora;
- Espectrômetro Bruker Alpha FT-IR pertencente ao Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora;
- Espectrômetro Bruker Avance III HD 300 (7.04 T), pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

## 3.2 MÉTODOS.

### 3.2.1 Extração de polissacarídeos de *Spirulina sp.*

Para obtenção de polissacarídeos constituintes em *Spirulina sp.*, amostras de biomassa seca foram submetidas a diferentes condições de extração de carboidratos (Figura 11).

#### 3.2.1.1 Condição 1 – Extração aquosa e alcalina.

Amostras de biomassa seca de *Spirulina sp.* (1g) foram dissolvidas em água destilada (20 mL) ou em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 3% pH 12 (20 mL e, em seguida, submetidas a banho ultrassônico a 40 kHz (5 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos) (OH *et al.*, 2011; TIAN *et al.*, 2015). Após incubação por 1 hora a 60°C, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm, 15 minutos) e o sobrenadante dividido para precipitação dos polissacarídeos solúveis com a adição de brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 1%, até formação de precipitado, ou de 2,5 volumes de etanol PA, na presença de NaCl 1 M, adicionados lentamente e sob agitação (ZHONG-WU e YONG-ZHENG, 1996; CHAIKLAHAN *et al.*, 2013).

Após 18 horas a -20°C, os polissacarídeos precipitados foram recuperados por centrifugação (2500 rpm, 15 minutos) e secos a vácuo para posterior análise por eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) como descrito em Métodos 3.2.3.1 e pela dosagem de açúcares totais pelo método de Dubois (1956). Os polissacarídeos extraídos por esta condição foram denominados fração PH<sub>2</sub>O/CETAVLON e fração PH<sub>2</sub>O/EtOH, para os extraídos com água e precipitados com CETAVLON 1% ou etanol PA, e fração PNaOH/CETAVLON e fração PNaOH/EtOH, para os extraídos com NaOH 3% e precipitados, respectivamente, com CETAVLON 1% e etanol PA.

### 3.2.1.2 *Condição 2 – Proteólise seguida de precipitação com diferentes solventes orgânicos.*

Inicialmente, a biomassa de *Sipurilina sp* (20 g) foi submetida ao processo de despigmentação com acetona PA (4 vezes, 2:5 p/v, 24 horas). Em seguida, o pó cetônico obtido (19,10 g) foi seco à temperatura ambiente, ressuspenso em tampão fosfato cisteína 0,05M p H 6,5 (100 mg/mL) e mantido em banho ultrassônico 40 kHz por 30 minutos, a 37°C. Após esse período, a suspensão foi submetida à proteólise com papaína (100:2 pó cetônico/papaína) a 60°C por 18 horas. Ao final desse tempo, a mistura de incubação foi centrifugada (2500 rpm, 30 minutos) e o sobrenadante obtido foi submetido à precipitação dos polissacarídeos com diferentes solventes orgânicos (precipitação fracionada com acetona PA ou adição de etanol PA ou metanol PA tanto na presença quanto ausência de NaCl 1M (ZHONG-WU e YONG-ZHENG, 1996; ROCHA *et al.*, 2005).

Amostra do sobrenadante (49 mL) foi submetido à precipitação fracionada com acetona PA nas proporções de 30%, 50%, 70% e 100% do volume do sobrenadante, adicionados lentamente e sob agitação. Após a adição do volume correspondente de acetona PA, a amostra foi armazenada a 4°C por 18 horas. Em seguida, o material foi centrifugado (2500 rpm, 30 minutos) e, ao sobrenadante obtido, foi adicionado acetona PA correspondente à próxima concentração. Após a adição de acetona referente à última concentração, o sobrenadante foi finalmente descartado. Os precipitados obtidos das frações 30%, 50%, 70% e 100% foram secos a vácuo, pesados e analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) como descrito em Métodos 3.2.3.1 e pela dosagem de açúcares totais pelo método de Dubois (1956). As frações foram denominadas de fração F30, fração F50, fração F70 e fração F100.

Alternativamente, os polissacarídeos presentes no sobrenadante (4,5 a 94 mL), foram submetidos à precipitação pela adição, lenta e sob agitação, de 2,0 volumes de etanol PA ou de metanol PA na presença ou ausência de NaCl 1M, e armazenadas a -20°C para precipitação total dos polissacarídeos. Após as 18 horas, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm, 30 minutos) e secas a vácuo, em seguida, analisadas por eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) como descrito em Métodos 3.2.3.1 e pela dosagem de açúcares totais. Os

polissacarídeos precipitados por essa condição foram denominados de fração PEtOH e fração PMetOH, fração PEtOH/NaCl e fração PMetOH/NaCl.

### 3.2.1.3 *Condição 3 – Proteólise com diferentes enzimas proteolíticas.*

Para a extração de polissacarídeos, 0,5 g da biomassa seca foi ressuspensa em tampão fosfato cisteína 0,05 M pH 6,5 e submetida a proteólise com papaína (100:2 biomassa seca/papaína) ou ressuspensa em 10 mL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 9,0 e submetida a proteólise com ALCALASE (0,5 g biomassa seca: 100 µL ALCALASE) (ROCHA *et al.*, 2005). Após incubação por 18 horas a 60°C, a mistura de incubação foi centrifugada (2500 rpm, 15 minutos) e ao sobrenadante foram adicionados ácido tricloroacético (TCA) até 10% (concentração final) na presença de NaCl 1M. Após 20 minutos em banho de gelo, as amostras foram novamente centrifugadas, como descrito acima, e aos sobrenadantes foram adicionados 2,5 volumes de etanol PA, lentamente e sob agitação (YANG, *et al.*, 2009). Após 18 horas a -20°C, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação (2500 rpm, 15 minutos), e os precipitados recuperados foram secos a vácuo e analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) como descrito em Métodos 3.2.3.1 e pela dosagem de açúcares totais pelo método de Dubois (1956). Nesta condição de extração, os polissacarídeos foram denominados de fração Ppapaína e fração Palcalase.

### 3.2.1.4 *Condição 4 – Lise celular acompanhada de proteólise com papaína.*

A biomassa seca (0,5 – 200,0 g) foi dissolvida em tampão fosfato cisteína 0,05 M pH 6,5 e submetida a ultrassom para lise celular em desruptor de células (5 ciclos de 50 V por 30 segundos, com intervalos de 30 segundos) (KURD *et al.*, 2015). Após lise celular, parte do material foi submetido proteólise pela adição de papaína (100:2 biomassa seca/papaína). Após incubação por 18 horas a 60°C, ambas amostras foram centrifugadas (2500 rpm, 15 minutos) e ao sobrenadante foi adicionado TCA na presença de NaCl 1 M, como descrito acima. Após 20 minutos em banho de gelo, as amostras foram novamente centrifugadas e aos sobrenadantes foram adicionados 2,5

volumes de etanol PA, lentamente e sob agitação (ROCHA, *et al.*, 2005; YANG, *et al.*, 2009). As amostras foram armazenadas a -20°C por 18 horas e, em seguida, centrifugadas novamente. Os polissacarídeos precipitados foram secos a vácuo para posterior análises por eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) como descrito em Métodos 3.2.3.1 e pela dosagem de açúcares totais pelo método de Dubois (1956). Os polissacarídeos extraídos por lise celular e proteólise foram denominados de fração DPB e, os extraídos apenas por lise celular de fração DB.

Em um segundo momento, a biomassa seca (200 g) foi submetida a despigmentação com diferentes solventes orgânicos (1:1 p/v). Os solventes utilizados foram o n-hexano, o diclorometano e a acetona, seguindo esta ordem de polaridade para despigmentação. Os solventes foram trocados 3 vezes, em intervalos de 24 horas. Após decantação do resíduo, o solvente foi removido e o resíduo seco em temperatura ambiente, obtendo-se a biomassa seca despigmentada, a qual foi submetido a lise celular e proteólise com papaína, como descrito anteriormente e analisado por eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) como descrito em Métodos 3.2.3.1 e pela dosagem de açúcares totais. Os polissacarídeos extraídos deste material despigmentado foram denominados de fração DPBdespig.

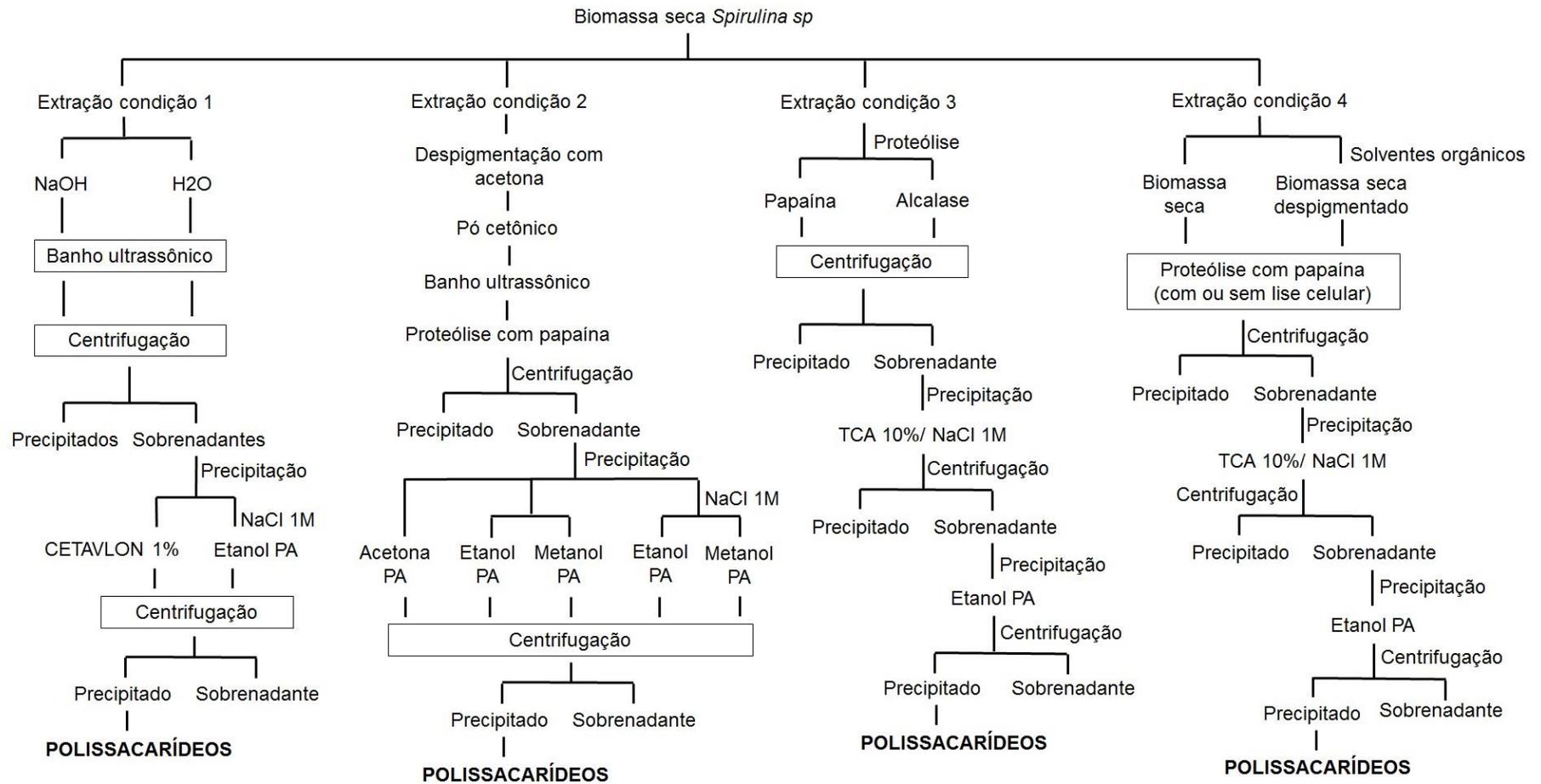


Figura 11. Extração de polissacarídeos em diferentes condições.

### 3.2.2 Cromatografia.

#### 3.2.2.1 Cromatografia de troca-iônica (Q-Sepharose Fast Flow).

O extrato DPB foi purificado por cromatografia de troca-iônica (*Ion Exchange Chromatography* – IEC) em resina de *Q-Sepharose Fast Flow*.

##### *Escala Analítica.*

A fração DPB (10 mg) foi ressuspensa em 3 mL de água destilada e aplicado na coluna de *Q-Sepharose* (1 mL de resina) previamente ativada com NaCl 4M e equilibrada com água destilada. Após aplicação da fração, a coluna foi lavada com água destilada e os polissacarídeos eluidos com três volumes (2 mL/min) de soluções de NaCl com concentrações crescentes (0-2 M, com incremento de 0,2 M) e uma fração de 3,0 M, totalizando 11 frações de 3 mL. As frações coletadas foram precipitadas com 2,5 volume de etanol PA, adicionados lentamente e sob agitação. Após 18 horas a - 20°C, as frações foram centrifugadas (2500 rpm, 15 minutos) e o precipitado coletado seco à vácuo e analisado por eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA).

##### *Escala Preparativa.*

A fração DPB (40 mg) foi ressuspensa em água destilada (1mg/mL) e submetido a banho ultrassônico (3 ciclos de 5 minutos a 37 °C) e centrifugado (2500 rpm, 15 minutos). O sobrenadante foi aplicado em coluna de *Q-Sepharose* contendo 20 mL de resina, previamente ativada com NaCl 4M e equilibrada com água destilada. Após aplicação da fração, a coluna foi lavada com água destilada (60 mL) e os polissacarídeos eluídos com concentrações crescentes de NaCl em *step wise* (0,5 M, 1,0 M, 2,0 M e 3,0 M). As frações obtidas foram precipitadas com 2,5 volume de etanol PA, adicionados lentamente e sob agitação. Após 18 horas a - 20°C, as frações foram centrifugadas (2500 rpm, 15 minutos) e os precipitados coletados foram secos à vácuo para posterior análise em eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA).

As frações contendo polissacarídeos sulfatados foram submetidos à diálise, liofilizadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e para análises químicas e espectroscópicas. Os polissacarídeos presentes nas frações eluídas por cromatografia de troca-iônica em *Q-Sepharose* de escala preparativa foram denominados de: DPB 0,5M, DPB 1,0M, DPB 2,0M e DPB 3,0M.

### 3.2.2.2 Cromatografia de gel filtração *Sephadex G-200*.

O peso molecular (PM) das frações DPB e DPBdespig e das  $\beta$ -eliminadas (DPB  $\beta$ -elim e DPBdesp  $\beta$ -elim, ver Métodos 3.2.5.1) foi estimado por cromatografia de gel filtração em *Sephadex G-200*, a qual possui limite de detecção de 1-200 KDa. As frações (50 mg) foram diluídas em 1 mL de ácido acético 0,05 M e aplicadas na coluna de gel filtração contendo 65 mL de resina. Após aplicação da fração, as mesmas foram eluídas com ácido acético 0,05M em 70 frações de 1 mL (fluxo 0,04 mL/min). Os padrões dextram sulfato (8KDa), condroitim sulfato (26 KDa), dextram (60-90KDa) e dextram (100-200 KDa) (10 mg/mL) foram aplicados à coluna de *Sephadex G-200* e eluídos da mesma forma como as amostras. Posteriormente, as frações recolhidas das amostras e padrões foram analisadas por dosagem de açúcar total descrita por Dubois (1956).

### 3.2.2.3 Cromatografia em papel.

As frações DPB e DPBdespig (100  $\mu\text{g}$ ) foram submetidas a hidrólise ácida com HCl 6 M, em capilar, a  $100^{\circ}\text{C}$  nos seguintes tempos: 1, 2, 4, 6 e 8 horas. Após hidrólise, as frações foram transferidas para microtubos, secas e neutralizadas no dessecador à vácuo sob NaOH PA. As frações secas foram ressuspensas em água destilada e aplicados 20  $\mu\text{g}$  das mesmas em papel Whatman nº 1 para, em seguida, serem submetidos à cromatografia descendente, em ácido isobutírico:hidróxido de amônia 1,25 M (5:3 v/v). Após 18-24 horas, o cromatograma foi seco em estufa com aquecimento e circulação de ar e os produtos redutores foram revelados com nitrato de prata em meio alcalino (TREVELYAN, PROCTER e HARRISON, 1950). Os padrões de monossacarídeos (xilose, ramnose, manose, glucose, galactose, ácido

glucurônico e ácido galacturônico) foram submetidos as mesmas condições de hidrólise ácida e de cromatografia descendente. O fator de retenção ( $R_f$ ) dos monossacarídeos foi determinado com o auxílio do programa *TotalLab TL120 1D v 2009* (*Nonlinear Dynamics Ltd*).

### **3.2.3 Eletroforese.**

#### *3.2.3.1 Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA)*

As frações de polissacarídeos (5  $\mu$ L de soluções em diferentes concentrações) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (0,5%) em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) 0,05 M, pH 9,0 (DIETRICH; DIETRICH, 1976). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal, refrigerada com gelo, submetida a uma diferença de potencial de 100 a 110 V por aproximadamente 1 hora, com o gel submerso em tampão PDA. Após a corrida eletroforética, o gel foi submerso em solução de CETAVLON 0,1%, por 2 horas para fixação dos polissacarídeos. Em seguida, o gel foi seco em corrente de ar quente e os polissacarídeos corados com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1%:etanol 50% por 20 minutos. O excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 1%: etanol 50%. Uma mistura padrão de GlicosaminoGlcans (GAG) (5  $\mu$ L), contendo condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato, na concentração de 1 mg/mL cada, foi aplicada no gel como padrão de migração e para acompanhar a corrida eletroforética.

#### *3.2.3.2 Eletroforese em Gel de Agarose em Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE)*

O peso molecular (PM) das frações DPB, DPB 2,0M, DPB 3,0M, DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim foram estimados por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE (100 mM de Tris, 100 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA) pH 8,3 como descrito por Bhilocha (2011). As frações (100  $\mu$ g) foram secas à vácuo e ressuspensas em 5  $\mu$ L de tampão de amostra (solução azul de bromofenol 0,2%, Glicerol 40% em

tampão TBE). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal DIGEL, submetida a uma diferença de potencial de 20 V por 30 minutos e 40 V por aproximadamente 3 horas, com o gel submerso em tampão TBE. Após a corrida, o gel foi removido da placa e corado com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% por 20 minutos, em seguida, o excesso de corante foi removido com solução ácido acético 1%. O PM modal dos compostos foi obtido por análise do padrão de migração utilizando o programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.). Foram utilizados como padrões de PM: dextram sulfato (8 KDa), condroitim-4-sulfato (26 KDa) e condroitim-6-sulfato (67 KDa).

### 3.2.3.3 *FACE - Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis.*

A composição monossacarídica das frações DPB, DPB 2,0M, DPB 3,0M, DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim, foi avaliada por *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE) como descrito por Cunha (2015), com algumas modificações.

#### *Derivatização dos monossacarídeos.*

Inicialmente as frações dos polissacarídeos obtidos foram hidrolisadas com HCl 6 M, em capilar, a 100°C por 2 horas. Após hidrólise, 40  $\mu$ g dos produtos de hidrólise foram secos e neutralizados a vácuo sob NaOH PA. Em seguida, as frações foram derivatizadas com 5  $\mu$ L de solução de 2-aminoacridona (AMAC) 50 mM, preparada previamente em DMSO: ácido acético (85:15). Após 15 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 5  $\mu$ L de solução recém preparada de cianoborohidreto de sódio 1 M. As frações foram incubadas em banho a 37°C por 16 horas e, em seguida, foram adicionados 5  $\mu$ L de Glicerol 60%. Os padrões de monossacarídeos (xilose, ramnose, manose, glucose, galactose, ácido glucurônico e ácido galacturônico) foram submetidos as mesmas condições de hidrólise ácida e derivatização com AMAC e cianoborohidreto das frações de polissacarídeos. As frações e padrões derivatizados, como descrito acima, foram analisadas imediatamente por eletroforese em gel de poliacrilamida ou congeladas a -80°C para posterior análise.

### *Preparo dos Géis de Poliacrilamida e Eletroforese.*

A FACE foi realizada em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell com lâminas de 7,2 cm com espaçadores de 0,75 mm. A corrida eletroforética foi realizada em gel de acrilamida-bisacrilamida 25%, preparados em sistema-tampão tris-borato pH7,0 e 6,8 e a corrida em tampão tris-Glcina-borato pH8,3.

Solução para dois géis de separação dos monossacarídeos (*resolving gel*) foi preparada a partir de 6,25 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida (38% de acrilamida e 2% de bisacrilamida), 2,5 mL de tampão tris-borato pH 7,0 (0,75 M de tris e 0,5 M de ácido bórico) e 1,25 mL de água destilada. Para iniciar a polimerização dos géis foram adicionados 70 µL de solução de persulfato de amônio 10% (APS) e 7 µL de *N,N,N',N'*-Tetrametiletenodiamino (TEMED). Ver-teu-se a solução para o conjunto de lâminas do sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell e foi adicionado butanol ao topo para total polimerização. Os géis de entrada (*stacking gel*) foram preparados com 2,20 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida (9,75% de acrilamida e 0,25 % de bisacrilamida), 1,0 mL de tampão tris-borato pH 6,8 (0,5 M de tris e 0,5 M de ácido bórico) e 0,8 mL de água destilada. Depois que o butanol foi removido, adicionou-se 50 µL de APS 10% e 10 µL de TEMED a solução do *stacking gel*, e em seguida, ver-teu-se a mesma sobre o *resolving gel*, colocando os pentes de amostra para total polimerização do *stacking gel*.

Decorrido a polimerização dos géis, 150 mL de tampão de corrida tris- Glicina-borato pH 8,3 (0,12 M tris/ 0,1 M Glcina/ 0,1 M borato) foi adicionado no anodo, em seguida, os pentes de amostra foram removidos e 2-4 µL das amostras e padrões foram aplicados. O catodo foi preenchido com aproximadamente 500 mL de tampão de corrida Tris-Glcina-borato e a corrida eletroforética foi realizada sob uma diferença de potencial de 100 V por cerca de 20 minutos, em seguida, aumentada para 220 V até o fim da corrida. A migração dos monossacarídeos foi acompanhada utilizando luz UV 320-400nm (luz negra). Após a corrida, as imagens foram digitalizadas em GelDoc-It Imaging System (transluminador UV com filtro em 365 nm e Câmara Scientific Grade CCD GelCam 310), em diferentes tempos de exposição.

### 3.2.4 Dosagens Químicas

#### 3.2.4.1 *Dosagem de Açúcares Totais.*

A dosagem de açúcares totais foi realizada segundo o método de Dubois (1956), com algumas modificações. As frações de polissacarídeos (20 µg) foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados água destilada para um volume final de 200 µL. Em seguida, foram adicionados 200 µL de fenol 5% e 1 mL de ácido sulfúrico PA, rápido e diretamente sobre a amostra. Os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos, agitados cuidadosamente em vórtex e novamente deixados em repouso, por 30 minutos. A leitura da absorvância foi realizada em 490 nm no espectrofotômetro SP-22. Os valores de açúcares totais foram calculados por meio de curva padrão da glucose.

#### 3.2.4.2 *Dosagem de Ácido Urônico.*

Ácido urônico foi dosado segundo o método de Di Ferrante (1956). Em um tubo contendo 100 µg de amostra, com volume final de 250 µL (completados com água destilada), foram adicionados 2,5 mL do reagente borato (tetraborato de sódio 0,4% em ácido sulfúrico) e 100 µL de carbazol 0,1% em metanol 95%. Os tubos foram agitados cuidadosamente em vórtex e aquecidos em banho fervente por 15 minutos. A leitura da absorvância das amostras, em temperatura ambiente, foi realizada em 525 nm no espectrofotômetro SP-22. Os valores de ácido urônico foram calculados por meio de curva padrão de ácido glucurônico.

#### 3.2.4.3 *Dosagem de Sulfato Inorgânico.*

A dosagem de sulfato foi conduzida como proposto por Dodgson (1961). Inicialmente, as frações de polissacarídeos (100 µg) foram hidrolisadas com HCl 8M, em capilar, a 100°C por 6 horas. Após hidrólise, as frações foram transferidas para tubos de 5 mL, secas e neutralizadas no dessecador à vácuo sob NaOH PA. Em

seguida, as frações secas foram ressuspensas em 1,5 mL de água e adicionados 0,5 mL do reagente de gelatina-cloreto de bário (0,5% gelatina e 0,5% cloreto de bário). As leituras de absorvância foram realizadas a 500 nm no espectrofotômetro SP-22. Os valores de sulfato inorgânico foram calculados por meio da curva padrão de sulfato de sódio, submetido as mesmas condições de hidrólise ácida das frações de polissacarídeos.

#### 3.2.4.4 *Dosagem de Proteínas.*

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976). Resumidamente, em tubos contendo as frações de polissacarídeos obtidos (100 µg) em volume final de 100 µL (completados com água destilada) foram adicionados 2,9 mL do reagente de Coomassie G-250, ou reagente de Bradford. A leitura da absorvância das amostras foi conduzida a 595 nm no espectrofotômetro SP-22. Os valores de proteína foram calculados por meio de curva padrão de albumina.

#### 3.2.4.5 *Dosagem de Fenólicos Totais.*

Para avaliação do teor de fenólicos totais foi utilizado o método de Folin Denis (1912) com algumas modificações. Em tubos de ensaio foram adicionados 300 µL das frações de polissacarídeos obtidos (100 µg), 500 µL água destilada e 500 µL de reagente de Folin Denis. Posteriormente, os tubos foram agitados e após 30 min adicionou-se 500 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio e agitou-se. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 3 minutos. Uma alíquota de 250 µL, foi retirada e colocada em placa de 96 poços para realizar a leitura de absorvância em 760 nm no espectrofotômetro Multiskan GO. Etanol e água foram utilizados como branco. Os valores de fenólicos totais foram calculados a partir de uma curva padrão de ácido tânico, feita nas mesmas condições.

Todas as dosagens foram realizadas em triplicata e expressas em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.5 Modificação química dos polissacarídeos sulfatados.

#### 3.2.5.1 *β-eliminação.*

As frações DPB e DPBdespig foram submetidos a  $\beta$ -eliminação (DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim, respectivamente) segundo Choi e Meyer (1975). Frações (1 mg/mL) foram submetidas a banho ultrassônico (3 vezes, 5 minutos a 37°C), em seguida, incubadas com solução de NaOH 0,15M. Após incubação por 48 horas a 37°C, as frações foram neutralizadas pela adição de HCl 1 M e precipitadas com etanol PA na presença de NaCl 1 M, adicionados lentamente e sob agitação. Decorrido 18 horas a -20°C, as frações foram centrifugadas (2500 rpm, 15 minutos) e secas a vácuo. Os precipitados obtidos foram dissolvidos e dialisados contra água destilada. Em seguida, as frações dialisadas foram liofilizadas e armazenadas a -20° para posteriores análises químicas e espectroscópicas.

#### 3.2.5.2 *Dessulfatação.*

As frações DPB e DPBdespig foram dessulfatados (DPB dessulf e DPBdespig dessulf) utilizando a técnica descrita por Kantor e Schubert (1956). As frações (290 mg) foram colocadas em suspensão com metanol/HCl 0,06 M em agitação contínua por 72 horas sob temperatura ambiente. A cada 24 horas o reagente metanol/HCl 0,06 M foi substituído. Os resíduos obtidos foram coletados por centrifugação (2500 rpm, 15 minutos), dissolvidos e dialisados contra água destilada. Em seguida, as frações dialisadas foram liofilizadas e armazenadas a -20° para posteriores análises químicas e espectroscópicas.

### 3.2.6 Análises espectroscópicas.

#### 3.2.6.1 *Espectroscopia de Raman.*

O espectro de Raman para as frações DPB, DPBdespig, DPB 2,0M, DPB 3,0M, DPB  $\beta$ -elim, DPBdespig  $\beta$ -elim, DPB dessulf e DPBdespig dessulf foi obtido utilizando o instrumento Bruker RFS 100 operando em 1064 nm. As análises *in situ* de cada fração sólida foi obtida até 1024 scans, coletadas em intervalos espectrais de 200  $\text{cm}^{-1}$  a 1800  $\text{cm}^{-1}$  com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$  e com a potência variando de 75 a 700 mW. Esses parâmetros foram selecionados para obtenção de uma melhor relação sinal-ruído, enquanto houve a manutenção da integridade física e química das amostras. A execução do experimento ocorreu no Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

#### 3.2.6.2 *Espectroscopia de Infravermelho.*

A análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR - Fourier-transform infrared) das frações DPB, DPBdespig, DPB 2,0M, DPB 3,0M, DPB  $\beta$ -elim, DPBdespig  $\beta$ -elim, DPB dessulf e DPBdespig dessulf, foi realizada utilizando o aparelho Burker Alpha FT-IR. O espectro foi coletado dentro do intervalo de 500  $\text{cm}^{-1}$  até 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando a técnica de reflexão total atenuada (ATR). A execução do experimento ocorreu no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

#### 3.2.6.3 *Ressonância magnética nuclear (RMN).*

As frações DPB, DPBdespig, DPB 2,0M, DPB 3,0M, DPB  $\beta$ -elim, DPBdespig  $\beta$ -elim, DPB dessulf e DPBdespig dessulf foram analisadas por RMN de  $^{13}\text{C}$  no estado sólido utilizando o espectrômetro Bruker Avance III HD 300 (7.04 T), operado a uma frequência de Larmor de 75,00 MHz. As análises foram executadas em uma sonda

MAS, em rotores de ZrO<sub>2</sub> (e tampas de Kel-F) de 4 mm. Os espectros foram obtidos numa frequência de giro de 10000 Hz, com tempo de relaxação de 2,0 segundos e um pulso de 90° de 2,5 µs utilizando giro-ao-ângulo mágico, e polarização cruzada. Os deslocamentos químicos foram padronizados de forma indireta por meio de amostra de Glcina, com sinal referente a carbonila em 176,00 ppm em relação ao TMS que é o padrão primário. A execução do experimento ocorreu no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear em Estado Sólido do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### **3.2.7 Atividade anticoagulante**

A atividade anticoagulante foi realizada pelo método USP (1965). Inicialmente, as frações (100 µg), DPB, DPBdespig, DPB β-elim, DPBdespig β-elim, DPB dessulf e DPBdespig dessulf, foram adicionadas em tubos de vidro e secas a vácuo. Depois de secas, elas foram ressuspensas em 160 µL de NaCl 0,9%. O plasma (200 µL) foi adicionado e os tubos incubados a 37 °C por 3 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 40 µL de CaCl<sub>2</sub> 1%, permanecendo por mais 1 hora em banho a 37°C. Transcorrido o período de incubação a atividade anticoagulante foi avaliada pelo aspecto do plasma (retração do coágulo), em triplicata. A heparina (165 UI) foi utilizada como controle positivo e o plasma citratado como controle negativo.

### **3.2.8 Atividade antioxidante.**

#### *3.2.8.1 Método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).*

A atividade antioxidante das frações DPB, DPBdespig, DPB β-elim, DPBdespig β-elim, DPB dessulf e DPBdespig dessulf foi avaliada pelo método de sequestro do radical DPPH descrito por Blois (1958), com algumas modificações. As frações foram avaliadas em placa de 96 poços nas concentrações de 250 a 0,98 µg/mL (diluições seriadas), para isso, foram transferidos para um poço da placa 100µL de uma solução 1 mg/mL das frações em DMSO 1% e foram realizadas 10 diluições

sucessivas 1:2 em DMSO 1%. Posteriormente foram adicionados 150 µL de solução de DPPH20 µg/mL em metanol. A placa foi incubada ao abrigo da luz por 2 horas e 30 minutos e, a absorvância foi medida em 517 nm no espectrofotômetro *Multiskan GO* a cada 30 minutos. Metanol e DMSO 1% foram usados como branco e ácido ascórbico e quercetina como controles positivos. Os resultados foram expressos em percentual de inibição (%I), que foi calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle (Ac) e a queda da absorvância das amostras (Aam), correlacionada com a queda do controle, representada por:

$$\%I = \frac{Ac - Aam}{Ac} \times 100$$

$$Ac = Abs\ final - Abs\ inicial$$

$$Aam = Abs\ final - Abs\ inicial$$

#### 3.2.8.2 Oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.

O ensaio foi baseado no método proposto por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Para o preparo da mistura reativa foi adicionado em um balão de vidro: 20 µL de ácido linoleico, 265 µL de tween 40, 50 µL de solução de β-caroteno a 10 mg/mL em clorofórmio e 1 mL de clorofórmio. O clorofórmio foi completamente eliminado em rotaevaporador e, em seguida, adicionou-se 25 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos. A emulsão, assim preparada, apresentou-se límpida com absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm.

Foram preparadas soluções estoque a 1 mg/mL das frações (DPB, DPBdespig, DPB dessulf, DPBdespig dessulf, DPB β-elim e DPBdespig β-elim) em DMSO 1%, e da substância referência (quercetina) em metanol. A partir da solução estoque foram feitas diluições com concentrações finais entre 38,46 a 0,15 µg/mL.

Para determinar as absorvâncias, foi adicionado em microplaca de 96 poços, 250 µL da emulsão e 10 µL das diluições das frações, assim como da substância de referência. O controle continha 250 µL da emulsão e 10 µL de metanol ou DMSO 1%. A microplaca foi incubada a 45°C por 2 horas, sendo realizadas leituras da absorvância imediatamente e a cada 15 minutos no comprimento de onda 470 nm no espectrofotômetro *Multiskan GO*. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação (%I), que foi calculada em relação ao decaimento da

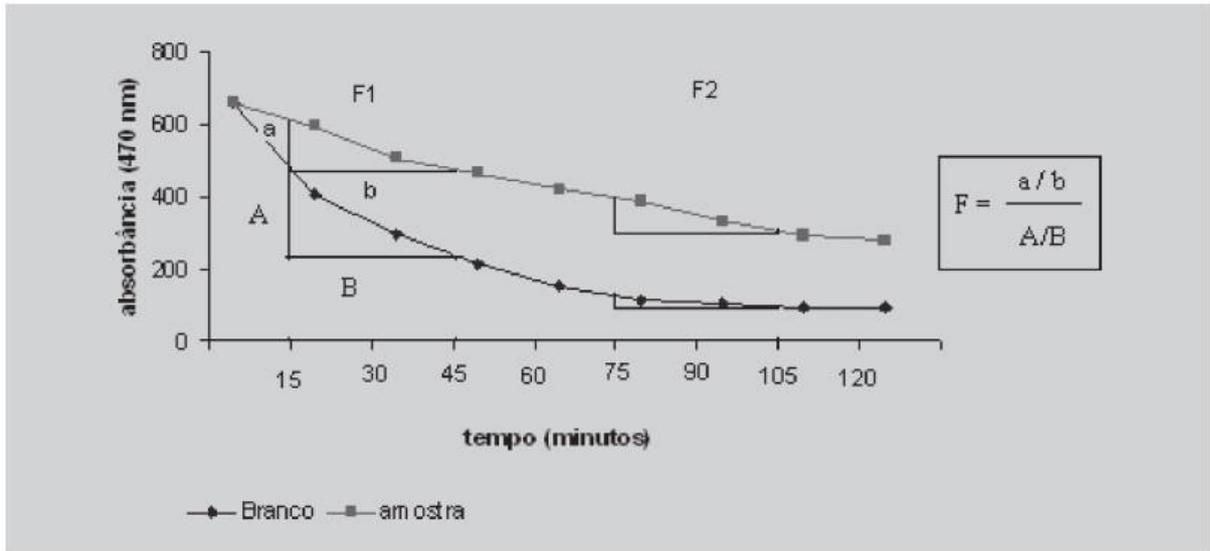
absorbância do controle ( $A_c$ ) e a queda da absorbância das amostras ( $A_{am}$ ), correlacionada com a queda do controle, representada na Equação abaixo:

$$\%I = \frac{A_c - A_{am}}{A_c} \times 100$$

$$A_c = Abs\ final - Abs\ inicial$$
$$A_{am} = Abs\ final - Abs\ inicial$$

### 3.2.8.3 *Estudo cinético da atividade antioxidante pelo ensaio em sistema $\beta$ -caroteno / ácido linoleico.*

A estimativa da eficiência da atividade antioxidante dos extratos avaliados no sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico foi avaliada pelo método do cálculo das tangentes das curvas obtidas neste mesmo sistema e obtendo-se os fatores cinéticos F1 e F2 (JARDINI e FILHO, 2007). A medida dos fatores cinéticos foi baseada em dois momentos distintos da reação: F1 foi calculado no tempo compreendido entre 15 a 45 minutos, pois é a parte da reação em que a formação de radicais peróxidos é maior, avaliando-se a capacidade do antioxidante em agir por mecanismos primários; F2 foi calculado no tempo compreendido entre 75 a 105 minutos, por se tratar de uma etapa avançada da reação é possível avaliar a eficiência do antioxidante em agir por mecanismos secundários, interferindo nas reações de formação de produtos secundários da reação de oxidação. Foi considerado o valor referente às tangentes o coeficiente resultante da divisão entre o cateto oposto (obtido pela diferença entre as absorbâncias dentro do tempo avaliado) e cateto adjacente (obtido pela diferença entre os tempos de 15 a 45 minutos (F1) e 75 a 105 minutos (F2)), como mostrado na Figura 12.



**Figura 12. Modelo de curva de decaimento obtida no sistema  $\beta$ -caroteno - ácido linoleico e obtenção das tangentes para o cálculo dos fatores cinéticos F1 e F2.** No cálculo de F (a) e (A) são os catetos opostos, obtidos através da diferença das leituras das absorvâncias (da amostra e do branco, respectivamente); (b) e (B) são os catetos adjacentes, obtidos através das diferenças entre os tempos (respectivamente, da amostra e do branco). FONTE: Jardini e Filho, 2007.

### 3.2.9 Análise estatística.

Os resultados da atividade antioxidante *in vitro* foram analisados utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3) e a análise estatística foi realizada pelo teste de variância ANOVA seguido pelo teste de *Tukey's*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

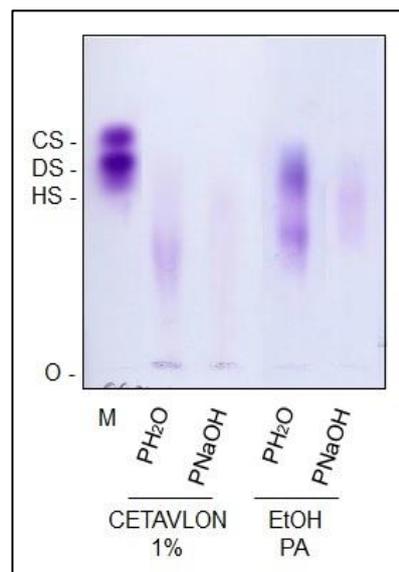
## 4 RESULTADOS.

### 4.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Spirulina sp.*

#### 4.1.1 Extração de polissacarídeos da microalga *Spirulina sp.*

A biomassa seca da microalga *Spirulina sp* foi submetida a diferentes condições para extração de polissacarídeos sulfatados, conforme descrito em Métodos 3.2.1, para avaliarmos qual condição forneceria melhor rendimento de extração.

Inicialmente, avaliamos a extração de polissacarídeos sulfatados em condição alcalina (solução de NaOH 3%, pH 12) em banho ultrassônico, 60°C por 1 hora. Para fins de comparação, extração aquosa foi realizada nas mesmas condições. Após esse processo, os carboidratos extraídos foram precipitados pela adição de detergente (CETAVLON) ou de etanol PA. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 13.



**FIGURA 13.** Eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3-diaminopropano (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações de polissacarídeos sulfatados obtidos por extração aquosa ou alcalina. Alíquotas das frações (10 mg/mL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,5% e corados com azul de toluidina. Fração PH<sub>2</sub>O/CETAVLON; fração PNaOH/CETAVLON; fração PH<sub>2</sub>O/EtOH; fração PNaOH/EtOH. M: mistura padrão de CS, DS e HS (5 µg de cada). O: origem.

Podemos observar a presença de bandas com metacromasia (coloração violácea) em todas as frações indicando a presença de polissacarídeos sulfatados, somente após concentração das mesmas (8X PH<sub>2</sub>O/CETAVLON; 8X PNaOH/CETAVLON; 2X PH<sub>2</sub>O/EtOH e 2X PNaOH/EtOH) (Figura 13).

Nota-se que a extração aquosa foi mais eficiente que a extração alcalina, uma vez que, tanto os polissacarídeos sulfatados precipitados com CETAVLON ou com etanol, bandas com maior intensidade foram observadas. Além disso, etanol foi o melhor agente para precipitação dos polissacarídeos sulfatados extraídos em ambas as condições.

A Tabela 1 apresenta os resultados de rendimento dos polissacarídeos obtidos pela extração aquosa ou alcalina. Devido ao baixo rendimento das frações obtidas pela precipitação com CETAVLON, somente os polissacarídeos precipitados com etanol PA foram quantificados pelo Método de Dubois.

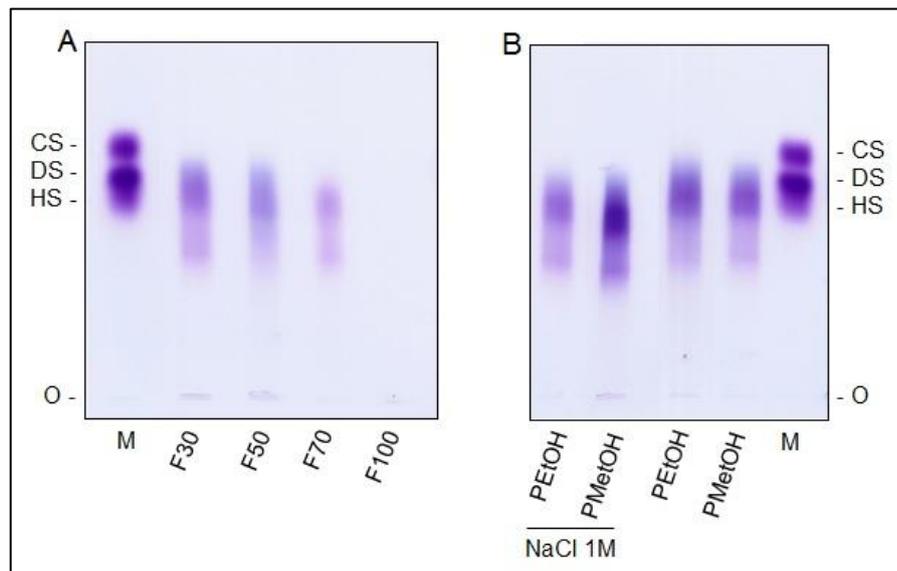
**TABELA 1. Rendimento da extração na condição aquosa e alcalina. Polissacarídeos precipitados com etanol PA.**

Fração	Peso biomassa seca (g)	Precipitado pós extração (mg)	Total de açúcar na biomassa (g)	Total de açúcar no precipitado (mg)	Rendimento (%)
PH <sub>2</sub> O/EtOH	0,45	56,1	0,051	4,21	8,28
PNaOH/EtOH	0,5	26,1	0,057	1,28	2,27

Fração PH<sub>2</sub>O/EtOH e fração PNaOH/EtOH: polissacarídeos extraídos com água e NaOH 3%, respectivamente, e precipitados com etanol PA.

O rendimento de polissacarídeos obtidos por extração alcalina foi inferior (2,27%) ao rendimento de polissacarídeos obtidos por extração aquosa (8,28%). Dessa forma, a extração aquosa seguida da precipitação com etanol PA foi mais eficiente que a extração em condição alcalina.

Com objetivo de melhorarmos o rendimento da extração aquosa, utilizamos uma enzima proteolítica no processo de extração dos polissacarídeos sulfatados de *Spirulina sp.* Após despigmentação com acetona, o pó cetônico obtido foi ressuspenso em tampão fosfato-cisteína pH 6,5, 0,05 M e mantido banho ultrassônico a 37°C, por 30 minutos. A suspensão foi submetida à proteólise com papaína a 60°C, por 18 horas. Ao final desse tempo, a suspensão foi centrifugada e os polissacarídeos submetidos à precipitação fracionada com acetona ou com adição de etanol PA ou metanol tanto em presença ou ausência de NaCl 1M. As frações obtidas foram concentradas (8X F30; F50; F70; 10X F100; 8X PEtOH; PEtOH /NaCl; PMetOH/NaCl; PMetOH) e submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 14.



**FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M pH 9,0 dos polissacarídeos sulfatados extraídos após proteólise com papaína seguida da precipitação com diferentes solventes orgânicos.** Aliquotas das frações (10 mg/mL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% e os polissacarídeos sulfatados corados com azul de toluidina. A: fração F30; fração F50; fração F70; fração F100. B: fração PEtOH; fração PEtOH /NaCl; fração PMetOH/NaCl; fração PMetOH. M: mistura padrão de CS, DS e HS (5 µg de cada). O: origem.

Podemos observar a presença de polissacarídeos sulfatados (bandas metacromáticas) em todas as frações obtidas, com exceção da fração F100.

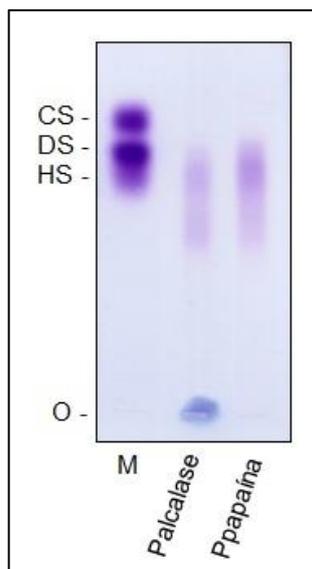
A Tabela 2 apresenta os cálculos de rendimento para as frações obtidas após proteólise com papaína e precipitadas com diferentes solventes orgânicos. Dentre as frações submetidas à precipitação com acetona, a fração F50 apresentou maior rendimento (16,59%). Já para as frações precipitadas com etanol PA, a fração PEtOH/NaCl foi a que obteve maior rendimento (18,59%). Por outro lado, polissacarídeos sulfatados precipitados com metanol PA, na ausência ou presença de NaCl, apresentaram rendimentos próximos (15,10% para PMetOH e 11,61 % para PMetOH/NaCl). Portanto, a extração de polissacarídeos utilizando enzima proteolítica seguida por precipitação com etanol PA, na presença de NaCl 1M, apresentou a melhor condição de extração.

**TABELA 2. Rendimento da extração na condição por proteólise seguida da precipitação com diferentes solventes orgânicos.**

<b>Fração</b>	<b>Peso biomassa seca (g)</b>	<b>Precipitado pós extração (mg)</b>	<b>Total de açúcar na biomassa (g)</b>	<b>Total de açúcar no precipitado (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>F 30</b>	19,1	24,4	0,554	0,488	0,09
<b>F 50</b>	19,1	313,5	0,554	91,85	16,59
<b>F 70</b>	19,1	1073,0	0,554	74,0	13,36
<b>F 100</b>	19,1	429,2	0,554	18,46	3,34
<b>PEtOH</b>	19,1	1285,8	1,062	68,15	6,42
<b>PMetOH</b>	0,45	23,5	0,050	7,68	15,10
<b>PEtOH/NaCl</b>	5,8	696,2	0,655	121,83	18,59
<b>MetOH/NaCl</b>	5,8	179,1	0,655	76,12	11,61

Fração F30; fração F50; fração F70; fração F100: polissacarídeos obtidos por proteólise com papaína seguido da precipitação com acetona PA a 30, 50, 70 e 100 %, respectivamente. Fração PEtOH e fração PMetOH: polissacarídeos obtidos por proteólise com papaína seguido da precipitação com etanol PA e metanol PA. Fração PEtOH/NaCl e fração PMetOH/NaCl: polissacarídeos obtidos por proteólise com papaína seguido da precipitação com etanol PA e metanol PA na presença de NaCl 1M.

Alternativamente, uma nova enzima proteolítica (ALCALASE) foi testada para extração de polissacarídeos de *Spirulina sp.* A biomassa seca foi ressuspensa nos tampões adequados (tampão fosfato-cisteína para papaína e Tris-HCl para ALCALASE) e incubados a 60°C, por 18 horas. Após esse período, ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado a suspensão, na presença de NaCl 1M, para remoção de fragmentos proteicos, em banho de gelo por 20 minutos. As suspensões foram centrifugadas, os polissacarídeos presentes no sobrenadante foram precipitados pela adição de etanol e submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA. A Figura 15 apresenta os resultados obtidos e a Tabela 3, o rendimento das frações obtidas após proteólise com papaína ou ALCALASE.



**FIGURA 15. Eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3- diaminopropano (PDA) 0,05 M pH 9,0 dos polissacarídeos sulfatados extraídos após proteólise com papaína ou ALCALASE.** Alíquotas das frações (10 mg/mL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% e os polissacarídeos sulfatados corados com azul de toluidina. Fração Palcalase (50 µg); fração Ppapaína (50 µg). M: mistura padrão de CS, DS e HS (5 µg de cada). O: origem.

Nota-se um padrão semelhante de migração eletroforética das bandas metacromáticas dos polissacarídeos extraídos após degradação proteolítica com ambas as enzimas. Observando a Tabela 3 também podemos notar que, a extração com papaína apresentou maior rendimento (20,23%,) que ALCALASE (14,67%).

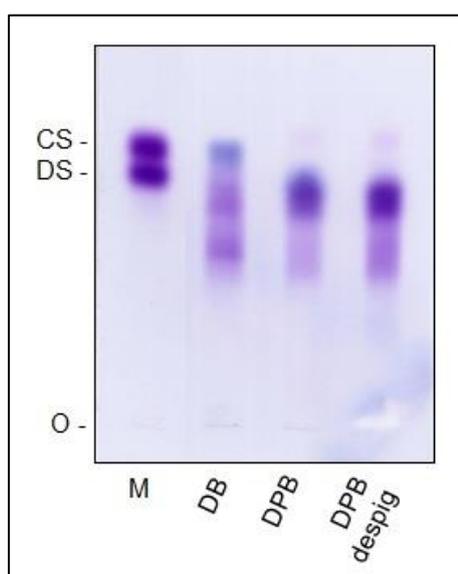
**TABELA 3. Rendimento da extração na condição de proteólise com diferentes enzimas (Métodos 3.2.1.3).**

Fração	Peso biomassa seca (g)	Precipitado pós extração (mg)	Total de açúcar na biomassa (g)	Total de açúcar no precipitado (mg)	Rendimento (%)
<b>Ppapaína</b>	0,5	33,1	0,057	11,43	20,23
<b>Palcalase</b>	0,5	28,4	0,057	8,29	14,67

Fração Ppapaína e fração Palcalase polissacarídeos obtidos por proteólise com as enzimas papaína e ALCALASE, respectivamente. Ambos polissacarídeos foram precipitados com etanol PA na presença de NaCl 1M, após precipitação de contaminantes com TCA 10%.

Por fim, foram avaliados os processos de despigmentação com solventes orgânicos de diferentes polaridades e de extração de polissacarídeos de *Spirulina sp* após lise celular acompanhada por proteólise com papaína. A biomassa seca, pigmentada ou despigmentada, foi ressuspensa em tampão fosfato-cisteína e submetida à lise celular em disruptor de células (5 ciclos de 50V por 30 segundos).

Após esse processo, parte do material foi submetido à proteólise com papaína e precipitação com TCA e etanol PA para extração de polissacarídeos, como mencionado anteriormente. Os polissacarídeos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose em tampão PDA. Os resultados estão apresentados na Figura 16.



**FIGURA 16. Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato 0,05 M pH 9,0 dos polissacarídeos extraídos após lise celular acompanhada por proteólise com papaína.** Aliquotas das frações (10 mg/mL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% e os polissacarídeos sulfatados corados com azul de toluidina. Fração DB (50 µg); fração DPB (50 µg) e fração DPBdespig (50 µg) M: mistura padrão de CS e DS (5 µg de cada). O: origem.

Analisando a Figura 16, podemos notar a presença de compostos sulfatados (metacromasia) tanto nas amostras submetidas apenas a lise celular (DB) quanto nas amostras que foram submetidas à lise celular seguida de proteólise (DPB e DPBdespig). As frações DPB e DPBdespig apresentaram bandas com migração eletroforética semelhante. Na fração DB foi observada a presença de uma banda com migração semelhante ao condroitim sulfato com coloração azul (ausência de metacromasia), indicando possíveis compostos não sulfatados como por exemplo o DNA.

A Tabela 4 apresenta os dados de rendimento para as amostras submetidas a extração com lise celular acompanhada de proteólise com papaína. Podemos observar que a amostra DB obteve o maior rendimento (19,88 %). Na mesma condição de extração, porém, com a adição da enzima proteolítica papaína, DPB e DPBdespig apresentaram valores próximos, 14,64% e 12,02%, respectivamente.

TABELA 4. Rendimento da extração na condição de lise celular acompanhada por proteólise.

Fração	Peso biomassa (g)	Precipitado pós extração (mg)	Total de açúcar na biomassa (g)	Total de açúcar no precipitado (mg)	Rendimento (%)
DB	0,5	39,0	0,057	11,23	19,88
DPB	200,0	8990,0	22,6	3308,0	14,64
DPBdespig	50,0	1860,0	5,65	678,9	12,02

Fração DB: polissacarídeos obtidos após lise celular seguida pela precipitação com etamol PA na presença de NaCl 1M, após precipitação de contaminantes com TCA 10%. Fração DPB e fração DPBdespig: polissacarídeos obtidos da biomassa pigmentada e despigmentada, respectivamente, por lise celular e proteólise com papaína seguida pela precipitação com etamol PA, na presença de NaCl 1M, após precipitação de contaminantes com TCA 10%.

Baseado nos resultados de extração apresentados, as análises seguintes foram realizadas com os polissacarídeos extraídos por lise celular seguida por proteólise com papaína (Métodos 3.2.1.4).

#### 4.1.2 Caracterização físico-química e espectroscópica das frações DPB e DPBdespig.

##### 4.1.2.1 Composição química.

As frações DPB e DPBdespig foram submetidas a dosagens de açúcar total, ácido urônico, sulfato, proteínas e compostos fenólicos, como descrito em Métodos 3.2.4. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5. Composição química das frações DPB e DPBdespig.

Fração	Açúcar Total (%)	Ácido Urônico (%)	Sulfato (%)	Proteína (%)	Fenólicos (%)	Razão U/A	Razão S/A
DPB	36,8 ± 0,05	12,17 ± 0,009	4,29 ± 0,002	n.d	n.d	0,31	0,26
DPB Despig	36,5 ± 0,04	13,12 ± 0,009	2,94 ± 0,001	n.d	n.d	0,33	0,18

Fração DPB e fração DPBdespig: polissacarídeos obtidos da biomassa pigmentada e despigmentada, respectivamente, por lise celular e proteólise com papaína seguida pela precipitação com etamol PA, na presença de NaCl 1M, após precipitação de contaminantes com TCA 10%. n.d: não detectável. Razão S/A: razão entre o conteúdo de sulfato e açúcar total. Razão U/A: razão entre o conteúdo de ácido urônico e açúcar total.

Podemos observar que o conteúdo de açúcar total (36,8% para DPB e 36,5% para DPBdespig) e ácido urônico (12,17% para DPB e 13,12% para DPBdespig) não

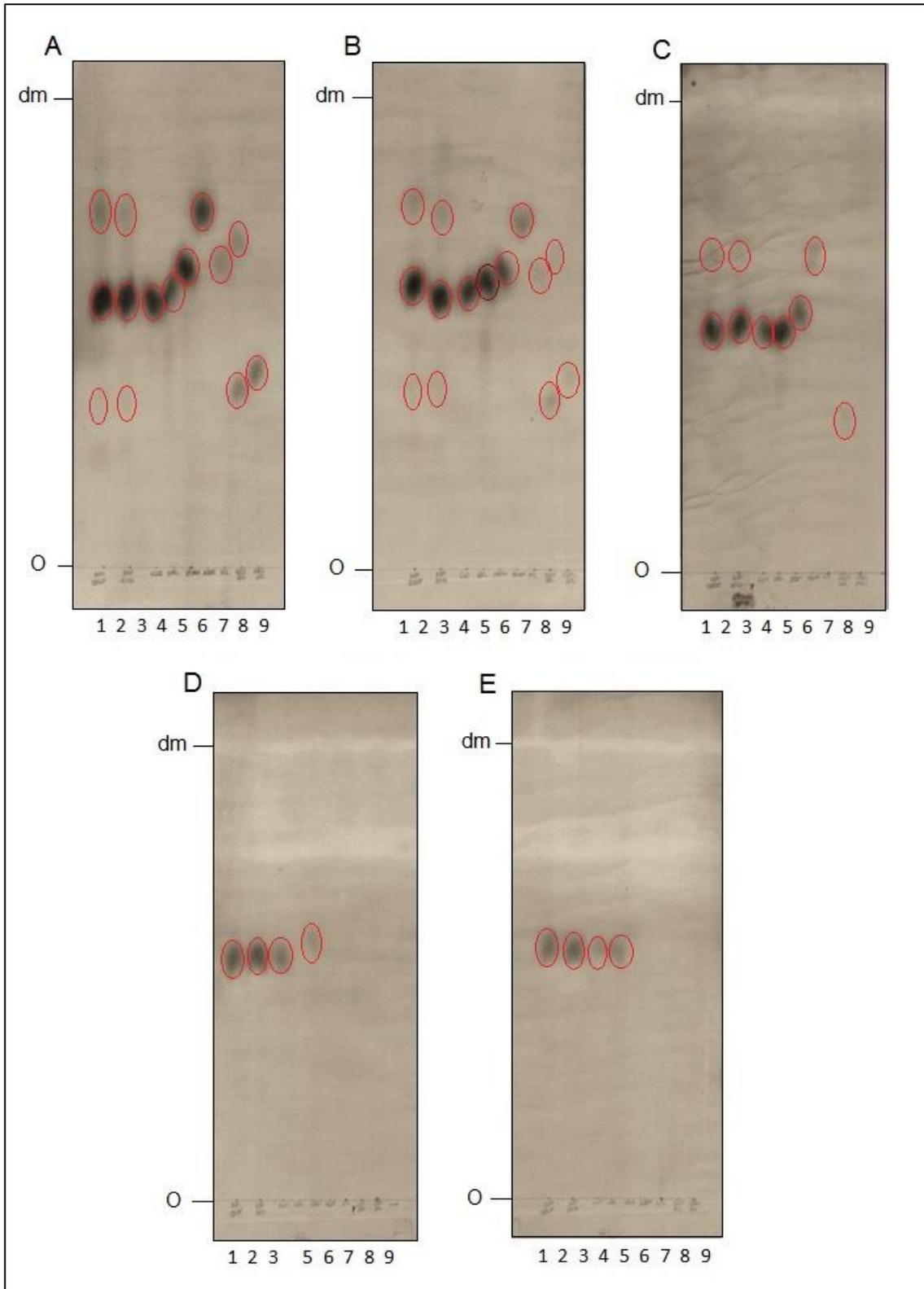
apresentou diferença entre frações, apresentando uma razão entre o conteúdo de ácido urônico e açúcar total (U/A) próximos DPB (0,31) e DPBdespig (0,33).

Em relação ao conteúdo de sulfato, DPB apresentou 4,29% de sulfato, enquanto, DPBdespig apresentou um valor inferior (2,94%). Esses resultados refletem na razão entre o conteúdo de sulfato e açúcar total (S/A) das frações (0,26 para DPB e 0,18 para DPBdespig).

Não foi detectada a presença de proteínas em nenhuma das frações. Compostos fenólicos também não apresentaram teor detectável pelo método de dosagem utilizado (Métodos 3.2.4.5).

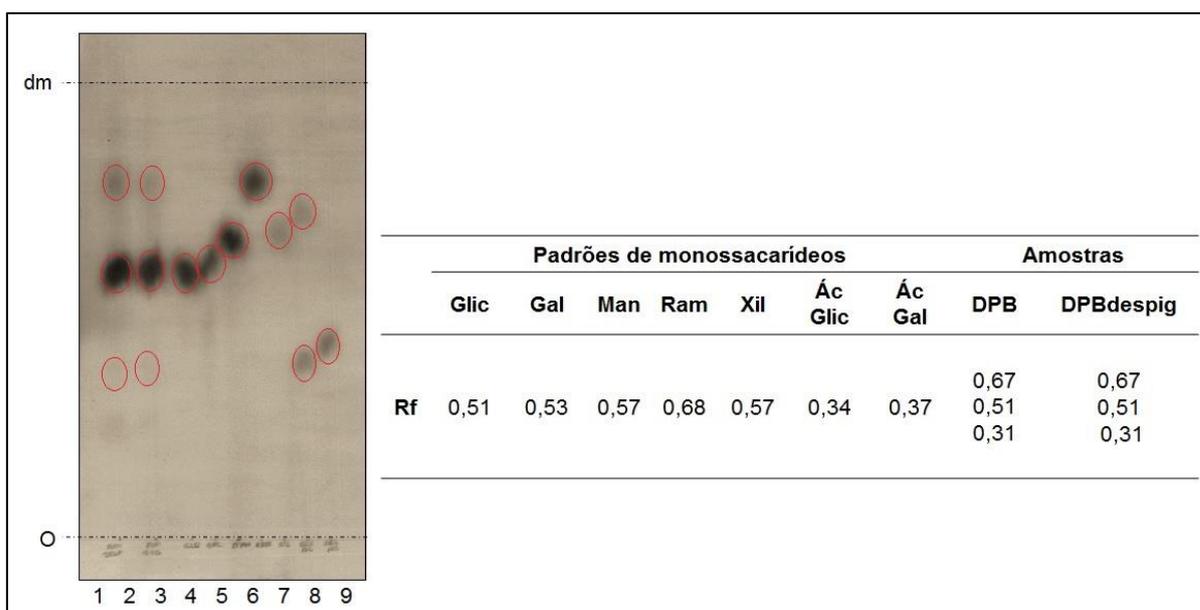
#### *4.1.2.2 Composição monossacarídica.*

Inicialmente, as frações DPB e DPBdespig foram submetidas à hidrólise ácida com HCl 6M a 100 °C em diferentes tempos (1, 2, 4, 6 e 8 h) e, em seguida, à cromatografia descendente em papel no sistema ácido isobutírico:hidróxido de amônia 1,25 M (5:3 v/v), como descrito em Métodos 3.2.2.3. Os cromatogramas podem ser observados na Figura 17.



**FIGURA 17. Cromatogramas em sistema ácido isobutírico:hidróxido de amônia 1,25 M (5:3 v/v) dos polissacarídeos DPB e DPBdespig hidrolisados com HCl 6M por 1 h (A), 2 h (B), 4 h (C), 6 h (D) e 8 h (E). 1: Fração DPBdesp; 2: Fração DPBpig; 3: Glucose; 4: Galactose; 5: Manose; 6: Ramnose; 7: Xilose; 8: Ácido Glucurônico; 9: Ácido Galacturônico. O: origem; dm: distância percorrida pela fase móvel. Nota: Em 6 h, não há a Galactose (n°4).**

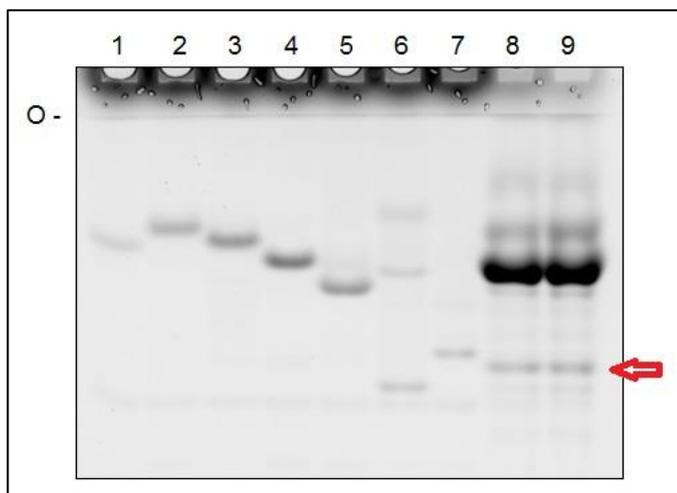
Podemos observar que tempos de hidrólise acima de 4 horas levam ao desaparecimento das bandas tanto nas frações quanto nos padrões, principalmente, as bandas características dos ácidos urônicos (ácido glucurônico e galacturônico) e xilose, o que não é observado até 2 horas de hidrólise. Dessa forma, a determinação da composição monossacarídica das frações DPB e DPBdespig, por cromatografia descendente em papel, foi realizada a partir dos dados de hidrólise de 1 hora (Figura 18).



**Figura 18. Cromatograma em sistema ácido isobutírico:hidróxido de amônia 1,25 M (5:3 v/v) dos polissacarídeos DPB e DPBdespig hidrolisados com HCl 6M por 1 h e Rf para compostos das frações e padrões.** 1: Fração DPBdesp; 2: Fração DPBpig; 3: Glucose; 4: Galactose; 5: Manose; 6: Ramnose; 7: Xilose; 8: Ácido Glucurônico; 9: Ácido Galacturônico. O: origem; dm: distância percorrida pela fase móvel; Glic: glucose; Gal: galactose; Man: Manose; Ram: ramnose; Xil: xilose; Ác Glic: ácido glucurônico; Ác Gal: ácido galacturônico.

O cromatograma das frações DPB e DPBdespig hidrolisadas por 1 hora (Figura 18) nos permitiu identificar, em ambas frações, os seguintes monossacarídeos: ramnose (Rf 0,67), glucose (Rf 0,51) e ácido glucurônico (Rf 0,31).

Para confirmar a composição monossacarídica obtida por cromatografia em papel, as frações foram submetidas à hidrólise com HCl 6 M por 2 horas a 100°C e, em seguida, à *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE). O eletrofluorograma está apresentado na Figura 19.



**FIGURA 19. Eletrofluorograma no sistema Tris-Glicina-Borato pH dos monossacarídeos das frações DPB e DPBdespig.** Frações analisadas em gel de acrilamida- bisacrilamida 25% marcadas com fluoróforo 2-aminoacridona (AMAC). 1: Xilose; 2: Ramnose; 3: Manose; 4: Glucose; 5: Galactose; 6: Ácido Glucurônico; 7: Ácido Galacturônico; 8: Fração DPB; 9: Fração DPBdespig. Seta vermelha: banda não identificada pelos padrões utilizados. O: origem.

O eletrofluorograma mostra que as frações, DPB e DPBdespig, apresentaram composição monossacarídica similar, com migração eletroforética correspondente aos padrões de glucose, ramnose, ácido glucurônico e galactose, esses resultados corroboram com a cromatografia descendente em papel. A galactose não foi visualizada na cromatografia em papel, pois no sistema ácido isobutírico:hidróxido de amônia 1,25 M (5:3 v/v) ela apresenta migração próxima à glucose.

Podemos notar a presença de uma banda intensa (indicada com uma seta na Figura 19) com migração eletroforética acima do ácido glucurônico, não identificada por nenhum padrão de monossacarídeo utilizado. Além disso, em ambas frações, observa-se uma banda acima da ramnose também não corresponde a nenhum padrão de monossacarídeo utilizado. O eletrofluorograma das frações DPB e DPBdespig apresentam ainda arrastes, indicando a hidrólise incompleta dos polissacarídeos.

A imagem do eletrofluorograma obtido (Figura 19) foi analisada pelo programa TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.) e a porcentagem relativa dos monossacarídeos das frações DPB e DPBdespig foi estabelecida (Tabela 6).

**Tabela 6. Porcentagem relativa de monossacarídeos das frações DPB e DPBdespig determinada por FACE em tampão tris-glicina-borato pH 8,3.**

Frações	% Relativa dos monossacarídeos identificados				
	Ramnose	Glucose	Galactose	Ácido Glucurônico	Banda intensa indeterminada
<b>DPB</b>	14,75	66,21	3,68	1,60	5,85
<b>DPBdespig</b>	18,15	62,96	4,37	1,87	5,73

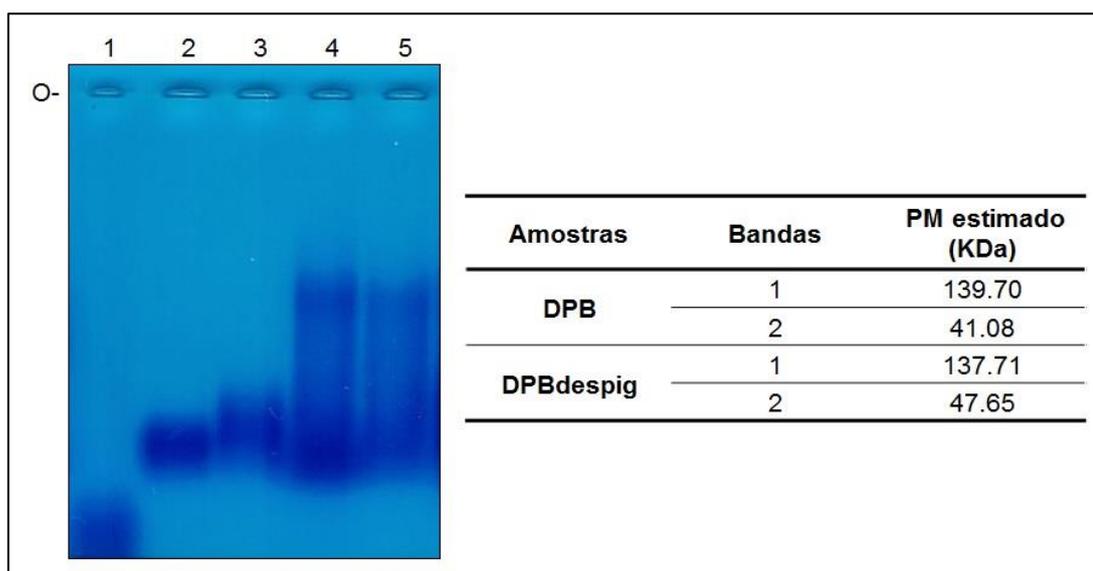
Fração DPB e fração DPBdespig: polissacarídeos obtidos da biomassa pigmentada e despigmentada, respectivamente, por lise celular e proteólise com papaína seguida pela precipitação com etamol PA, na presença de NaCl 1M, após precipitação de contaminantes com TCA 10%.

A porcentagem relativa dos monossacarídeos ramnose, glucose, galactose e ácido glucurônico para a fração DPB foi 14,75; 66,21; 3,68; e 1,60%, respectivamente, e para DPBdespig 18,15; 62,96; 4,37; e 1,87%. Nota-se que para ambas frações a glucose é o monossacarídeo majoritário.

A banda indeterminada com migração entre o ácido glucurônico e galacturônico apresentou uma porcentagem relativa expressiva, 5,85% para DPB e 5,73% para DPBdespig.

#### 4.1.2.3 Peso molecular modal.

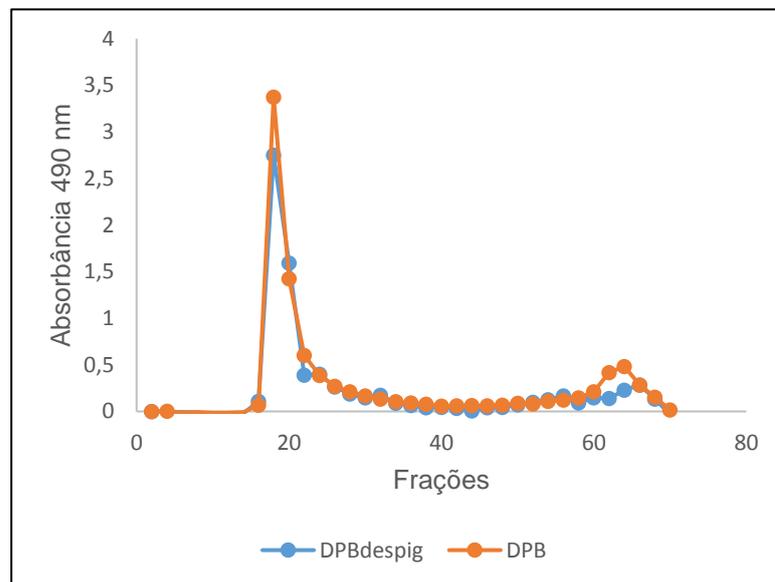
O peso molecular (PM) modal das frações DPB e DPBdespig foi estimado por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE (Figura 20).



**Figura 20. Gel de agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3 para estimar o peso molecular modal das frações DPB e DPBdespig.** As frações foram analisadas em gel de agarose 1% coradas com azul de toluidina 0,1%. 1: Dextram sulfato (8KDa); 2: Condroitim-4-sulfato (26KDa); 3: Condroitim-6-Sulfato (67KDa); 4: Fração DPB pig; 5: Fração DPB desp. O: origem.

Podemos observar que a fração DPB apresentou uma faixa de PM que varia de 181,37 KDa a 31,87 KDa, com duas bandas de maior intensidade podendo ser identificadas (139,70 KDa e 41,80 KDa). Resultados semelhantes foram observados para a fração DPBdespig, que apresentou o PM variando de 177,88 KDa a 38,11 KDa e, as bandas de 137,71 KDa e 47,65 KDa com maior intensidade. Dessa forma, podemos observar a heterogeneidade dos polissacarídeos sulfatados presentes em ambas frações.

A cromatografia de gel filtração em Sephadex G-200 apresentou duas regiões de PM distintos para ambas frações (Figura 21).



**FIGURA 21. Perfil cromatográfico das frações DPB e DPBdespig em coluna de gel filtração Q-Sephadex G-200.** Frações eluídas com ácido acético 0,05M em 70 frações de 1 mL (fluxo 0,04 mL/min).

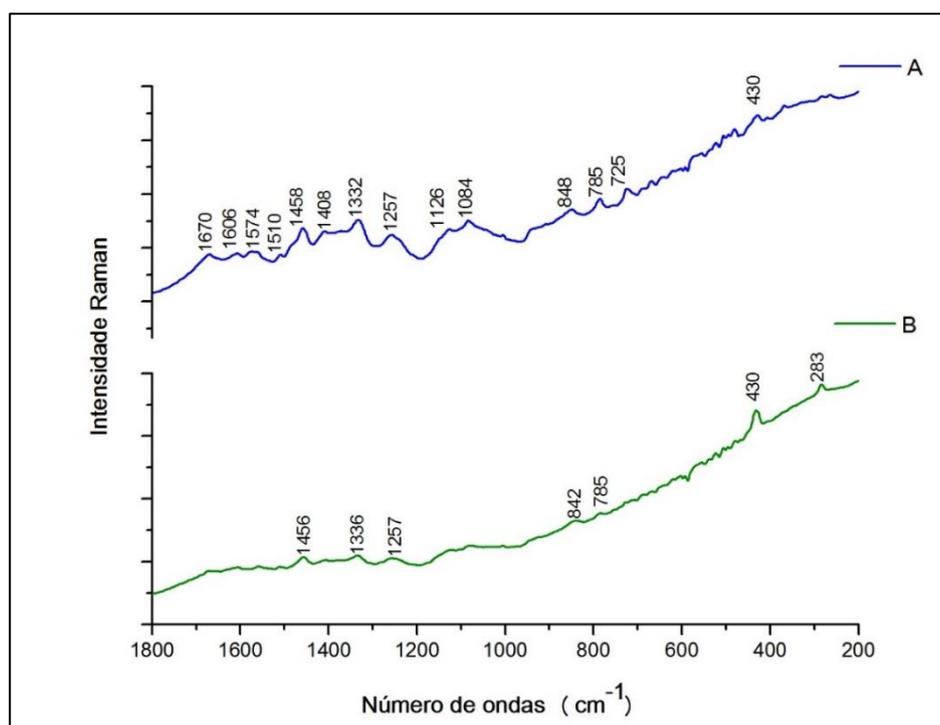
O perfil cromatográfico das frações em *Sephadex G-200* confirmou a presença de duas frações de polissacarídeos com PM modal bem distintos (um de alto PM e outro de baixo PM). Esses resultados corroboram com a eletroforese em gel de agarose em tampão TBE (Figura 20).

#### 4.1.2.4 Caracterização espectroscópica.

Com o intuito de observar similaridades e diferenças entre os polissacarídeos sulfatados obtidos, assim como a presença de grupos funcionais típicos desses polímeros, as frações DPB e DPBdespig foram submetidas a análises

espectroscópicas de Raman, Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear  $^{13}\text{C}$  (RMN) em estado sólido (CP-MAS).

Os espectros de Raman das frações DPB e DPBdespig estão apresentados na Figura 22. A análise dos espectros foi realizada pela comparação entre as principais bandas apresentadas e dados da literatura.



**FIGURA 22. Espectros de Raman das frações DPB (A) e DPBdespig (B).**

Podemos observar na Figura 22 que a espectroscopia de Raman não foi tão eficiente para a amostra DPBdespig quanto para DPB. Apesar disso, foi possível realizar a detecção de bandas com características similares à amostra DPB. Os resultados para as atribuições as bandas estão listadas na Tabela 7.

TABELA 7. Bandas dos espectros do Raman das frações DPB e DPBdespig.

Bandas Fração (cm <sup>-1</sup> )					Atribuição as bandas	Referências
DPB		DPBdespig				
1458		1456			CH <sub>2</sub>	VASKO, BLACKWEL e KOENIG, 1971; MATTSIRO, 1996
1408					sim COO <sup>-</sup>	PIELESZ, BINIAS e PALUCH, 2011
1332		1336			HCC/ HCO/ COH do anel de piranose	VASKO, BLACKWEL e KOENIG, 1971; MATTSIRO, 1996
1257		1257			ass S=O	PIELESZ, BINIAS e PALUCH, 2011
1126					CO/ CC/ flexão de CO	VASKO, BLACKWEL e KOENIG, 1971; MATTSIRO, 1996
1084					COH	VASKO, BLACKWEL e KOENIG, 1971
					sim O=S=O	PIELESZ, BINIAS e PALUCH, 2011
848		842			flexão C-O-S	PIELESZ, BINIAS e PALUCH, 2011
785	725	430	430	283	Esqueleto do carboidrato	VASKO, BLACKWEL e KOENIG, 1971; MATTSIRO, 1996

Fração DPB e fração DPBdespig: polissacarídeos obtidos da biomassa pigmentada e despigmentada, respectivamente, por lise celular e proteólise com papaína seguida pela precipitação com etanol PA, na presença de NaCl 1M, após precipitação de contaminantes com TCA 10%.

Podemos notar a presença de bandas características de polissacarídeos sulfatados em ambas frações.

Os resultados para os espectros de IV estão apresentados na Figura 23. A análise dos espectros de IV e sua comparação com dados da literatura (Tabela 8) permitiram confirmar a presença de grupamentos característicos de polissacarídeos sulfatados já evidenciados por espectroscopia de Raman, além de, bandas similares entre as frações.

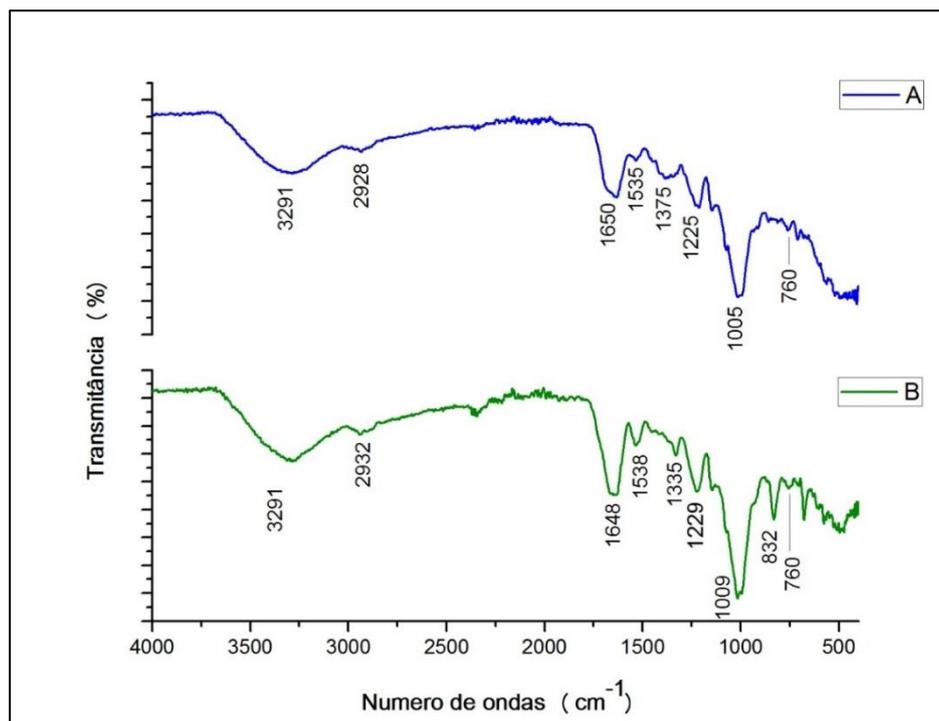


FIGURA 23. Espectros de infravermelho das frações DPB (A) e DPBdespig (B).

TABELA 8. Bandas dos espectros do Infravermelho das frações DPB e DPBdespig.

Bandas Fração (cm <sup>-1</sup> )		Atribuição as bandas	Referências
DPB	DPBdespig		
3291	3291	OH	ZHANG <i>et al.</i> ,2011b;
2930	2932	ass CH	CAMARA <i>et al.</i> ,2011; MADJOUR <i>et al.</i> , 2009; MAO <i>et al.</i> ,2009
1652	1648	ass COO <sup>-</sup>	MAO <i>et al.</i> ,2009; CAMARA <i>et al.</i> ,2011
1375	1335	Flexão OH de ácido urônicos	SYNYTSYA e NOVAK, 2014
1225	1229	ass S=O	ZHANG <i>et al.</i> ,2009; MADJOUR <i>et al.</i> , 2009; MAO <i>et al.</i> ,2009
1005	1009	C-O-C ciclo osídico	ZHANG <i>et al.</i> ,2011b; CAMARA <i>et al.</i> ,2011; MADJOUR <i>et al.</i> , 2009; MAO <i>et al.</i> ,2009
	838	C-O-S posição axial	ZHANG <i>et al.</i> ,2009
760	760	Ligações α-D glucanas (1→4)(1→6)	SYNYTSYA e NOVAK, 2014

Fração DPB e fração DPBdespig: polissacarídeos obtidos da biomassa pigmentada e despigmentada, respectivamente, por lise celular e proteólise com papaína seguida pela precipitação com etanol PA, na presença de NaCl 1M, após precipitação de contaminantes com TCA 10%.

Os resultados dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  das frações DPB e DPBdespig podem ser observados na Figura 24.

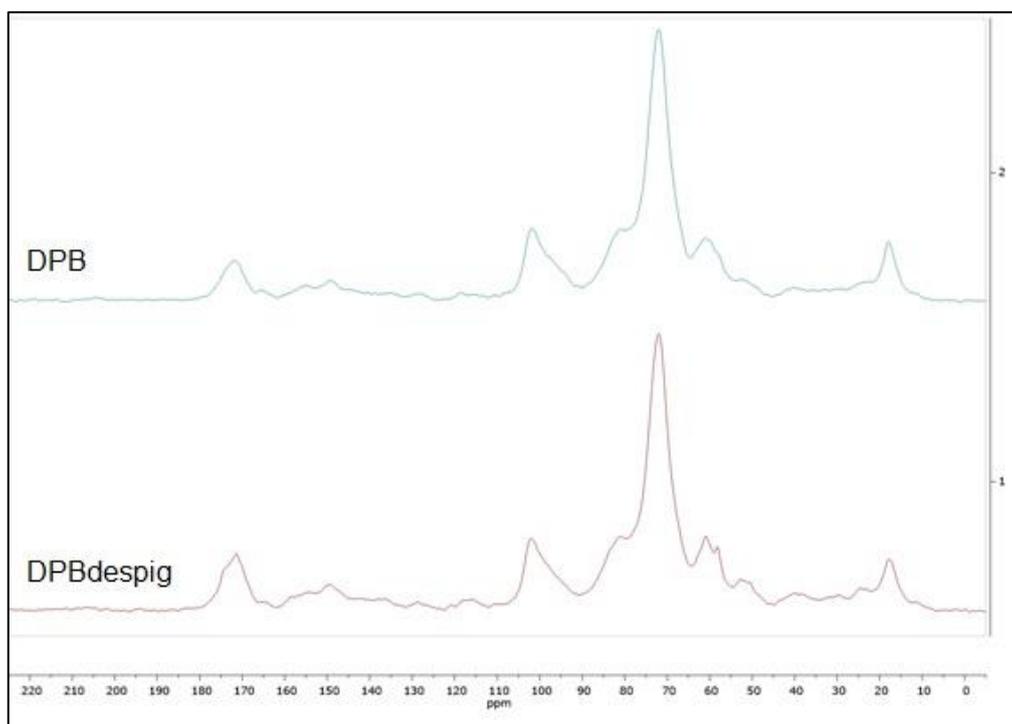


FIGURA 24. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB e DPBdespig.

Nota-se que os espectros das frações DPB e DPBdespig foram similares. A Tabela 9 apresenta as atribuições aos sinais de RMN identificadas nos espectros das frações.

TABELA 9. Sinais do RMN  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB e DPBdespig.

Bandas Fração (ppm)		Atribuição as bandas	Referências
DPB	DPBdespig		
172	172	COO <sup>-</sup> ou C=O	CHEN <i>et al.</i> , 2005; UGOALA, NDUKWE e AYO, 2016
102	102	C1 (C anomérico)	ZHANG <i>et al.</i> , 2011a
81	81	C4	ROBIC <i>et al.</i> , 2009
72	72	C2, C3, C5	UGOALA, NDUKWE e AYO, 2016; ZHANG <i>et al.</i> , 2011a
61	60	C6	ROBIC <i>et al.</i> , 2009
58	58	C6	
18	18	CH <sub>3</sub> Ramnose	NEP.e CONWAY, 2010

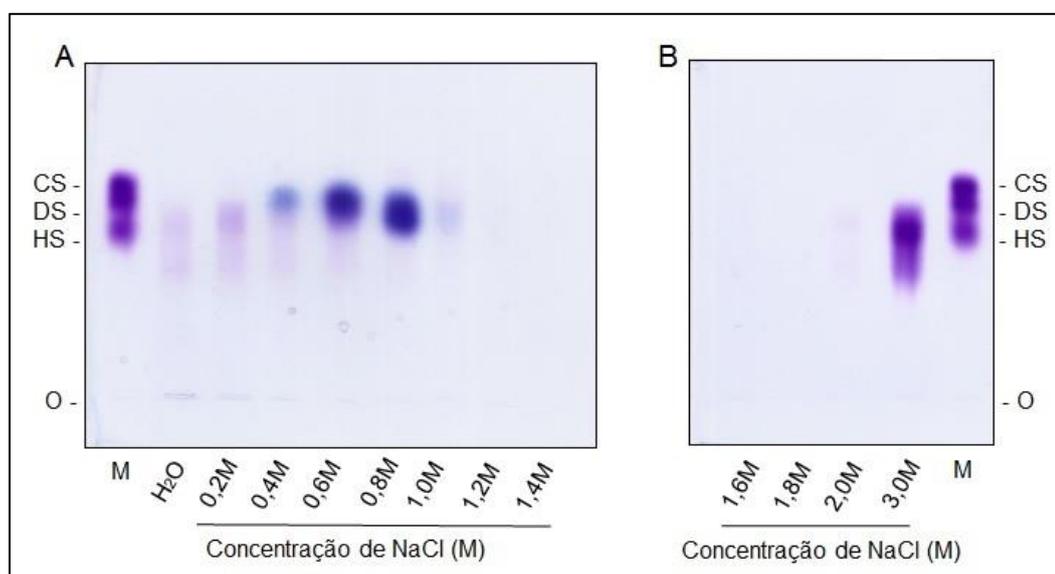
Fração DPB e fração DPBdespig: polissacarídeos obtidos da biomassa pigmentada e despigmentada, respectivamente, por lise celular e proteólise com papaína seguida pela precipitação com etamol PA, na presença de NaCl 1M, após precipitação de contaminantes com TCA 10%.

## 4.2 PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS *Spirulina sp* POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM Q-SEPHAROSE (FAST FLOW).

Para purificação dos polissacarídeos sulfatados presentes em *Spirulina sp* a fração DPB foi submetida à cromatografia de troca-iônica em *Q-sepharose Fast Flow*.

### 4.2.1 Cromatografia de troca iônica em *Q-Sepharose Fast Flow* em escala analítica.

Inicialmente, para estabelecermos o padrão de eluição dos polissacarídeos sulfatados da fração DPB, realizamos a cromatografia de troca iônica em *Q-Sepharose Fast Flow* em escala analítica. A fração DPB (10 mg) solubilizada em água destilada foi aplicada na coluna (1 mL de resina) e eluída com soluções de NaCl em concentrações crescentes, como descrito em Métodos 3.2.2.1. As frações foram posteriormente submetidas à precipitação por etanol e analisadas por eletroforese em gel de agarose em tampão PDA pH 9,0 (Figura 25).



**FIGURA 25.** Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações obtidas por cromatografia de troca iônica (*Q-Sepharose*) em escala analítica. Alíquotas (5  $\mu$ L) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão PDA e os polissacarídeos corados com azul de toluidina 0,1%. A fração DPB foi eluída em concentrações crescentes de NaCl, de 0 a 3,0M. M: mistura padrão de CS, DS e HS (5  $\mu$ g de cada). O: origem.

Analisando a Figura 25 podemos notar que os polissacarídeos sulfatados da fração DPB foram eluídos nas concentrações entre 0,2 e 1,0 M de NaCl (Figura 25 A) e em duas concentrações mais altas, 2,0 e 3,0 M (Figura 25 B). Esses resultados

indicam a presença de populações heterogêneas de polissacarídeos quanto a densidade de carga negativa.

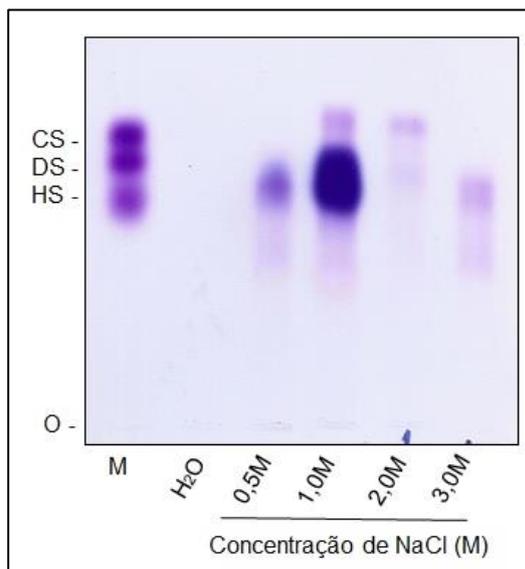
Notamos que as bandas das frações entre 0,2 M e 1,0 M apresentam migração eletroforética semelhante, porém, nas frações eluídas entre 0,4 e 1,0 M observa-se a presença de bandas de coloração azul, sugerindo a presença de compostos não sulfatados (Figura 25 A).

Com os resultados da cromatografia de troca iônica em escala analítica podemos verificar que os polissacarídeos da fração DPB são eluídos em concentrações de NaCl inferiores a 1,0 M e superiores a 2,0 M.

#### **4.2.2 Cromatografia de troca iônica em *Q-Sepharose Fast Flow* em escala preparativa.**

Cromatografia de troca-iônica em escala preparativa foi realizada para purificação de maiores quantidades de polissacarídeos da fração DPB para posteriores análises químicas e espectroscópicas.

A fração DPB (50 mg) foi aplicada na coluna de *Q-Sepharose Fast Flow* (20 mL de resina) e eluída em *step wise* nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 M de NaCl, como descrito em Métodos 3.2.2.1. A Figura 26, apresenta a eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05 M, pH 9,0 das frações eluídas e precipitadas com etanol.



**FIGURA 26. Eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3- diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações obtidas por cromatografia de troca iônica (Q-Sepharose) em escala preparativa.** Alíquotas (5  $\mu$ L) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão PDA e os polissacarídeos corados com azul de toluidina 0,1%. A fração DPB foi eluída nas concentrações 0, 0,5, 1,0, 2,0 e 3,0 M de NaCl. M: mistura padrão de CS, DS e HS (5  $\mu$ g de cada). O: origem.

Podemos observar que as frações 0,5M e 1,0M apresentaram bandas de coloração em azul, como visto nas frações eluídas abaixo de 1,0 M em na Q-Sepharose em escala analítica.

Os polissacarídeos eluídos com 2,0 e 3,0 M apresentaram bandas metacromáticas com diferentes perfis de migração eletroforética. A fração 2,0M apresentou banda com migração eletroforética mais alta que a fração 3,0 M, sugerindo uma diferença de densidade de carga negativa entre essas frações.

Com base nestes resultados apenas as frações 2,0 e 3,0M foram submetidas as caracterizações físico-químicas e espectroscópicas.

### 4.2.3 Caracterização físico-química e espectroscópica das frações DPB 2,0 e 3,0M.

#### 4.2.3.1 Composição química

As frações DPB 2M e DPB 3M foram caracterizadas quimicamente por meio de dosagens químicas, como descrito em Métodos 3.2.4. Os resultados da composição químicas dessas frações estão apresentados na Tabela 10.

**TABELA 10. Dosagens químicas das frações purificadas em cromatografia de troca iônica em *Q-Sepharose Fast Flow*.**

Fração	Açúcar Total (%)	Ácido Urônico (%)	Sulfato (%)	Proteína (%)	Razão U/A	Razão S/A
<b>DPB 2,0M</b>	78,58 ± 0,05	19,01 ± 0,008	3,57 ± 0,04	n.d	0,22	0,10
<b>DPB 3,0M</b>	26,01 ± 0,02	7,80 ± 0,014	9,37 ± 0,003	n.d	0,28	0,81

Fração DPB 2,0M e fração DPB 3,0M: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína - e eluídos em *Q-Sepharose Fast-Flow* com NaCl 2,0M e 3,0M, respectivamente. n.d: não detectável. Razão S/A: razão entre o conteúdo de sulfato e açúcar total. Razão U/A: razão entre o conteúdo de ácido urônico e açúcar total.

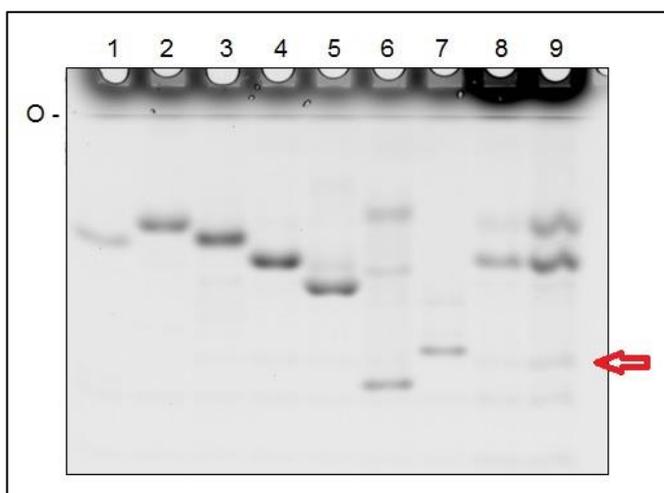
Podemos observar que o conteúdo de açúcar total da fração DPB 2,0M (78,58%) foi superior ao da DPB 3,0M (26,01%). Quanto ao ácido urônico, nota-se que DPB 2,0M apresentou conteúdo cerca de 2 vezes maior (19,01%) que DPB 3,0M (7,80%). Porém, a razão entre ácido urônico e açúcar total (U/A) apresentou valores próximos (0,22 para DPB 2,0M e 0,28 para DPB 3,0M), visto que a fração DPB 2,0M apresentou maior teor de açúcar total.

Em relação ao conteúdo de sulfato, observa-se que o conteúdo de sulfato da fração DPB 3,0M (9,37%) foi superior a DPB 2,0M, (3,57%). A razão entre sulfato e açúcar total (S/A) de DPB 3,0M também mostrou ser maior (0,81 para DPB3,0M e 0,10 para DPB 2,0M). Esses resultados corroboram com o gel de agarose em tampão PDA (Figura 26), uma vez que, a fração DPB 3,0M apresentou menor migração que DPB 2,0M devido à interação desse polímero carregado negativamente com a amina do tampão PDA.

A presença de proteínas também não foi detectada em nenhuma das frações utilizando o método de Bradford (1976).

#### 4.2.3.2 Composição monossacarídica.

A composição monossacarídica das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M foi avaliada por *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE) pela comparação dos perfis de migração de monossacarídeos padrões e das frações, como descrito em Métodos 3.2.3.3. Os resultados podem ser observados no eletrofluorograma abaixo (Figura 27).



**FIGURA 27. Eletrofluorograma no sistema Tris-Glicina-Borato pH dos monossacarídeos das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M.** Frações analisadas em gel de acrilamida- bisacrilamida 25% marcadas com fluoróforo 2-aminoacridona (AMAC). 1: Xilose; 2: Ramnose; 3: Manose; 4: Glucose; 5: Galactose, 6: Ácido Glucurônico; 7: Ácido Galacturônico; 8: Fração DPB 2,0M; 9: Fração DPB 3,0M. O: origem.

Analisando o eletrofluorograma podemos notar que tanto a fração DPB 2,0 M quanto DPB 3,0M apresentaram bandas com migração correspondente ao perfil dos padrões de ramnose, glucose e galactose. Além disso, podemos notar a presença de uma banda entre o ácido glucurônico e galacturônico (seta vermelha na Figura 27) que não corresponde à migração de nenhum padrão utilizado.

Os resultados da porcentagem relativa dos monossacarídeos presentes nas frações estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11. Porcentagem relativa de monossacarídeos das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M determinada por FACE em tampão tris-Glicina-borato pH 8,3.**

Fração	% Relativa dos monossacarídeos identificados			
	Ramnose	Glucose	Galactose	Banda indeterminada
<b>DPB 2,0M</b>	16,71	74,60	2,06	6,63
<b>DPB3,0M</b>	38,28	54,49	2,66	4,57

Fração DPB 2,0M e fração DPB 3,0M: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína - e eluídos em Q-Sepharose Fast-Flow com NaCl 2,0M e 3,0M, respectivamente.

A porcentagem dos monossacarídeos na fração DPB 2,0M foi de 16,71% ramnose, 74,60% glucose e 2,06% galactose e para DPB 3,0 M foi de 38,28% ramnose, 54,49% glucose e 2,66% galactose. Podemos notar que, em ambas frações o monossacarídeo majoritário foi a glucose. Porém, observa-se que a ramnose

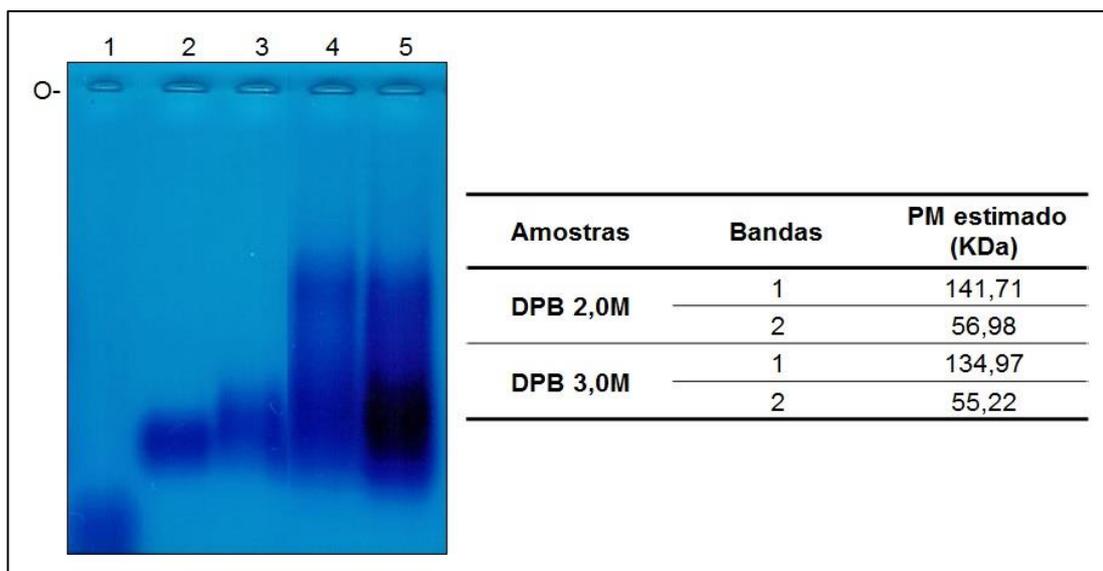
apresentou uma porcentagem 2 vezes maior em DPB 3,0M (38,28%) que na fração DPB 2,0M (16,71%).

Podemos observar ainda que, a composição monossacarídica das frações DPB 2,0 e 3,0M manteve-se similar a fração DPB (Figura 27 e 19), com exceção da presença do ácido glucurônico que foi identificado apenas na fração DPB.

Além disso, a banda indeterminada com migração entre os padrões ácido Glcurônico e galacturônico vista no eletrofluorograma da fração DPB (Figura 19) também foi identificada nas frações DPB 2,0M e 3,0M (Figura 27).

#### 4.2.3.3 *Peso molecular modal.*

O PM modal das frações purificadas, DPB 2,0 e 3,0M, foi estimado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE. Os resultados são apresentados na Figura 28.



**Figura 28. Gel de agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3 para peso molecular modal das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M.** Frações analisadas em gel de agarose 1% coradas com azul de toluidina 0,1%. 1: Dextran sulfato (8KDa); 2: Condroitim-4-sulfato (26KDa); 3: Condroitim-6-Sulfato (67KDa); 4: Fração DPB 2,0M; 5: Fração DPB 3,0M. O: origem.

Podemos observar que assim como para a fração DPB, as frações purificadas apresentaram uma faixa de PM. A faixa de PM da fração DPB 2,0 M variou de 192,30 KDa a 31,87 KDa, enquanto para DPB 3,0M essa faixa foi de 188,58 KDa a 31,00 KDa. Porém, bandas com maior intensidade foram observadas em ambas

frações, sugerindo como PM modal para DPB 2,0M de 141,75 e 56,98 KDa e para DPB 3,0M, 139,97 KDa e 55,22 KDa.

Como esperado, a purificação por cromatografia de troca iônica em *Q-Sepharose* foi capaz de separar os polissacarídeos presentes em DPB quanto a densidade de carga negativas (DPB 2,0 e 3,0M), entretanto, polímeros de alto e baixo PM ainda continuam presentes nas frações purificadas.

#### 4.2.3.4 Caracterização espectroscópica.

A caracterização espectroscópica das frações DPB 2,0 e 3,0M também foi realizada por análises espectroscópicas de Raman, Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em estado sólido (CP-MAS).

A análise dos espectros foi realizada pela comparação entre as principais bandas apresentadas nos espectros e dados da literatura, buscando similaridades e diferenças entre as frações purificadas, que possam auxiliar do polissacarídeo sulfatado obtido da microalga *Spirulina sp.*

Os espectros de Raman das frações DPB 2,0 e 3,0M, assim como da fração DPB, estão apresentadas na Figura 29.

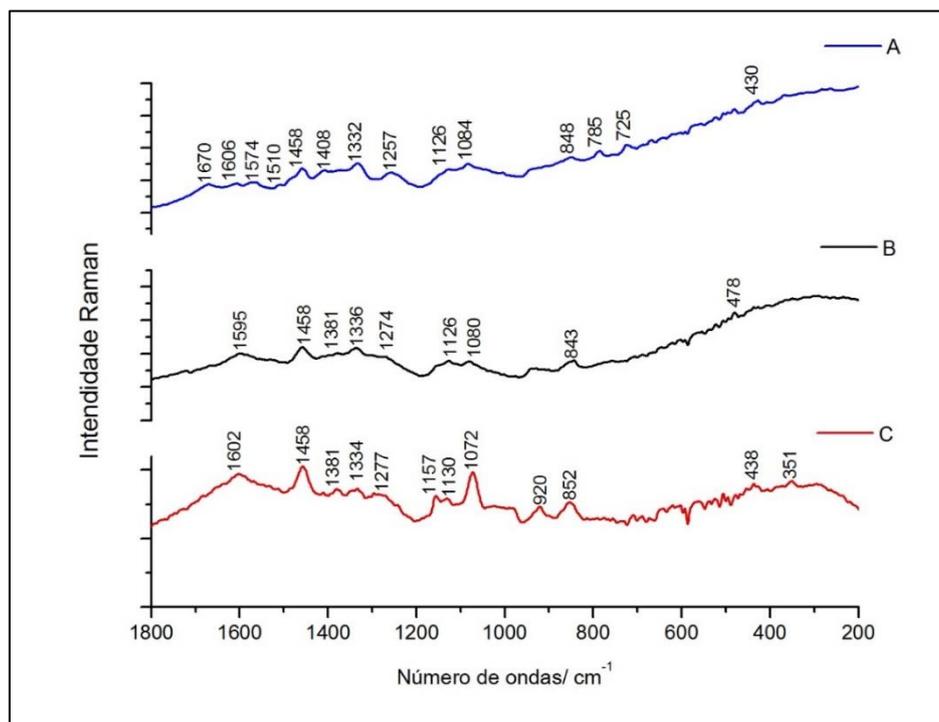


FIGURA 29. Espectros de Raman das frações DPB (A), DPB 2,0M (B) e DPB 3,0M (C).

A Tabela 12 apresenta as atribuições aos espectros de RAMAN das frações DPB, DPB 2,0M e 3,0M.

**TABELA 12. Bandas dos espectros do Raman das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M.**

Bandas Fração (cm <sup>-1</sup> )						Atribuições as bandas	Referências
DPB	DPB 2,0M		DPB 3,0M				
1458	1458		1458			CH <sub>2</sub>	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996
1408						sim COO <sup>-</sup>	
		1381		1381		CH <sub>3</sub>	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971
1332		1336		1334		HCC/ HCO/ COH do anel de piranose	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996
		1274		1277		CH <sub>2</sub> OH de cadeias laterais/ OH de C1	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971
1257						ass S=O	PIELESZ,BINIAS, PALUCHI, 2011
					1157	sim SO <sub>2</sub>	MATSHIRO, 1996
1126		1126		1130		CO/ CC/ flexão de CO	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996
						COH	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971
1084		1080		1072		sim O=S=O	PIELESZ,BINIAS, PALUCHI, 2011
				920		COH da cadeia de polissacarídeo	PIELESZ,BINIAS, PALUCHI, 2011
848		843		852		flexão C-O-S	PIELESZ,BINIAS, PALUCHI, 2011
785	725	430	478	438	351	Esqueleto do carboidrato	VASKO, BLACKWELL e KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996

Fração DPB: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína. Fração DPB 2,0M e fração DPB 3,0M: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína - e eluídos em *Q-Sepharose Fast-Flow* com NaCl 2,0M e 3,0M, respectivamente.

A figura 30 apresenta os espectros de IV, analisando-os é possível confirmar a presença de bandas de polissacarídeos sulfatados já evidenciados por espectroscopia Raman. As atribuições às bandas estão apresentadas na Tabela 13.

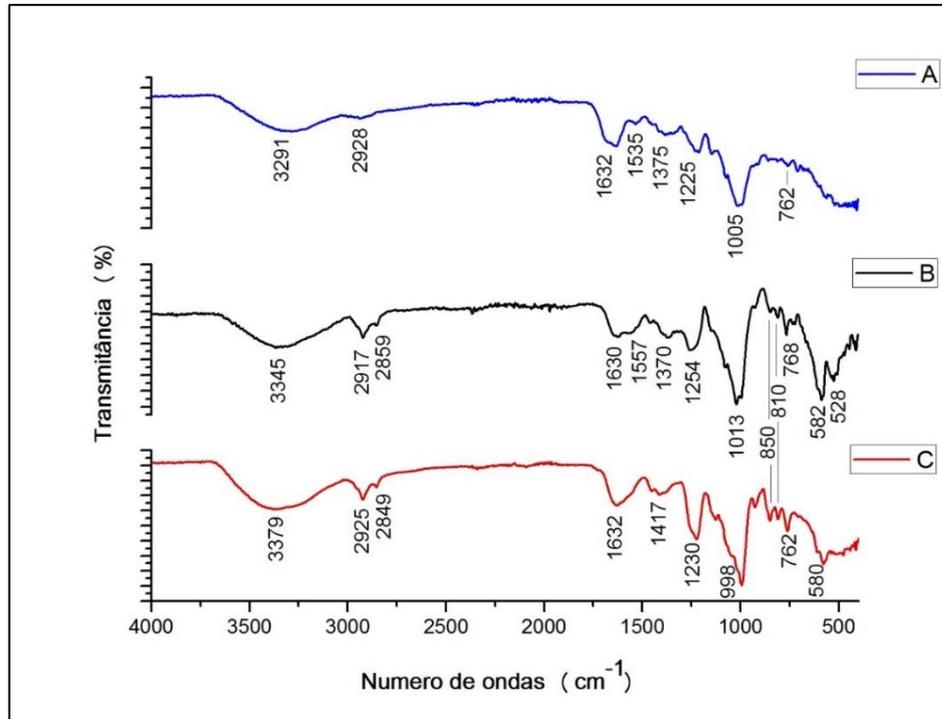


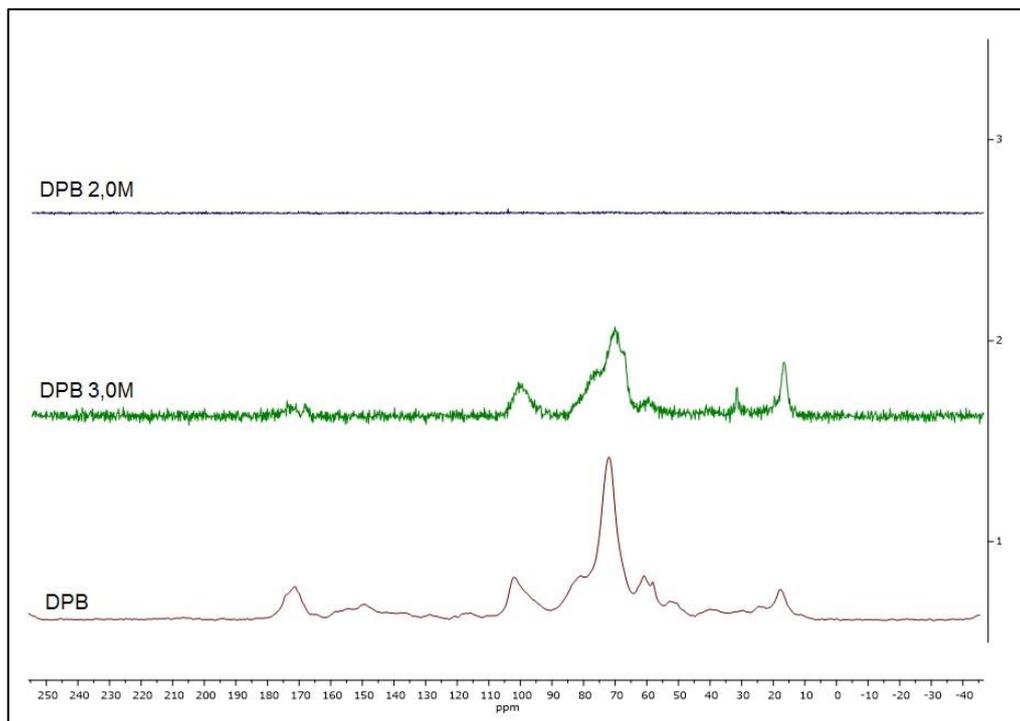
FIGURA 30. Espectros de infravermelho das frações DPB (A), DPB 2,0M (B) e DPB 3,0M (C).

TABELA 13. Bandas dos espectros do Infravermelho das frações DPB, DPB 2,0M e DPB 3,0M.

Bandas Fração (cm <sup>-1</sup> )			Atribuições as bandas	Referências
DPB	DPB 2,0M	DPB 3,0M		
3291	3345	3379	OH	ZHANG <i>et al.</i> ,2011b; CAMARA <i>et al.</i> ,2011; MAO <i>et al.</i> ,2009; MADJOURB <i>et al.</i> ,2009
2930	2917	2925	ass CH	SYNYTSYA e NOVAK, 2014
	2854	2849	sim CH	
1652	1630	1632	ass COO <sup>-</sup>	CAMARA <i>et al.</i> ,2011; MAO <i>et al.</i> ,2009
		1417	Flexão O-C=O de ácido urônico	MADJOURB <i>et al.</i> ,2009
1375	1370		Flexão OH de ácido urônicos	SYNYTSYA e NOVAK, 2014
1225	1254	1230	ass S=O	MAO <i>et al.</i> ,2009; MADJOURB <i>et al.</i> ,2009; ZHANG <i>et al.</i> ,2009
1005	1013	998	C-O-C ciclo osídico	ZHANG <i>et al.</i> ,2011b; CAMARA <i>et al.</i> ,2011; MAO <i>et al.</i> ,2009; MADJOURB <i>et al.</i> ,2009
	850	850	C-O-S posição axial	MAO <i>et al.</i> ,2009
	810	810	sim C-O-SO <sub>4</sub>	ZHANG <i>et al.</i> ,2011b
760	768	762	Ligações α-D glucanas (1→4)(1→6)	SYNYTSYA e NOVAK, 2014
		580	Ligações α-D glucanas (1→3)	

Fração DPB: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína. Fração DPB 2,0M e fração DPB 3,0M: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína - e eluídos em *Q-Sepharose Fast-Flow* com NaCl 2,0M e 3,0M, respectivamente.

Os resultados da RMN  $^{13}\text{C}$  das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M estão apresentados na Figura 31.



**FIGURA 31. Espectros de RMN em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB, DPB 2,0M e DPBM 3,0M.**

Podemos observar que a espectroscopia de RMN em estado sólido para a fração purificada DPB 2,0M não foi eficiente como para as demais frações avaliadas, não sendo possível a identificação de nenhum sinal.

A frações DPB 3,0M apresentou um sinal ruído intenso o que pode ter atrapalhado a leitura de alguns sinais. Porém, para DPB 3,0M ainda foi possível identificar alguns sinais e observar algumas similaridades e diferenças com a fração DPB. Na Tabela 14 estão listadas as atribuições aos sinais identificados.

TABELA 14. Sinais do RMN  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB 2,0M e 3,0M.

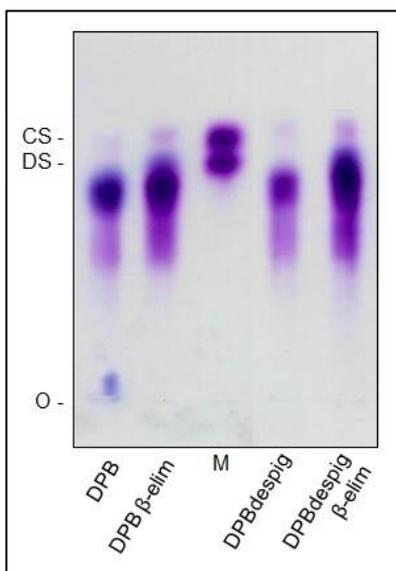
Bandas Fração (ppm)			Atribuições as bandas	Referências
DPB	DPB 2,0M	DPB 3,0M		
172	n.d	172	COO <sup>-</sup> ou C=O	CHEN <i>et al.</i> ,2005; UGOALA, NDUKWE, AYO, 2016
102	n.d	100	C1 (C anomérico)	ZHANG <i>et al.</i> ,2011a
81	n.d		C4	ROBIC <i>et al.</i> ,2009
72	n.d	76 70	C2, C3, C5	UGOALA, NDUKWE, AYO, 2016; ZHANG <i>et al.</i> ,2011 <sup>a</sup>
61	n.d	59	C6	ZHANG <i>et al.</i> ,2011b; ROBIC <i>et al.</i> ,2009
58	n.d		C6	ZHANG <i>et al.</i> ,2011b
18	n.d	17	CH <sub>3</sub> Ramnose	NEP.e CONWAY, 2010

Fração DPB: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína. Fração DPB 2,0M e fração DPB 3,0M: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína - e eluídos em *Q-Sepharose Fast-Flow* com NaCl 2,0M e 3,0M, respectivamente. n.d: não detectável.

### 4.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DE *Spirulina sp.*

#### 4.3.1 $\beta$ -eliminação.

Para avaliar a presença de proteínas que pudessem estar ligadas a estrutura dos polissacarídeos extraídos, as frações DPB e DPBdespig foram submetidas a  $\beta$ -eliminação, seguida, por eletroforese em gel de agarose me tampão PDA. Os resultados estão apresentados na Figura 32.



**FIGURA 32. Eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3- diaminopropano (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações DPB e DPBdespig modificadas por  $\beta$ -eliminação.** Alíquotas das frações (10 mg/mL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% e os polissacarídeos sulfatados corados com azul de toluidina. Fração DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim M: mistura padrão de CS e DS (5  $\mu$ g de cada). O: origem.

A eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão PDA (Figura 32) mostrou bandas com metacromasia mais intensa nas frações submetidas a  $\beta$ -eliminação.

#### 4.3.1.1 Caracterização físico-química das frações $\beta$ -eliminadas.

Para avaliar se o processo de  $\beta$ -eliminação alterou a composição dos polissacarídeos das frações DPB e DPBdespig, as frações  $\beta$ -eliminadas foram submetidas a dosagens químicas, *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE) e eletroforese em gel de agarose em tampão TBE.

##### 4.3.1.1.1 Composição química.

Os resultados da composição química das frações DPB e DPBdespig antes e após  $\beta$ -eliminação estão apresentados na Tabela 15.

TABELA 15. Caracterização química das frações DPB e DPBdespig antes e após modificação por  $\beta$ -eliminação.

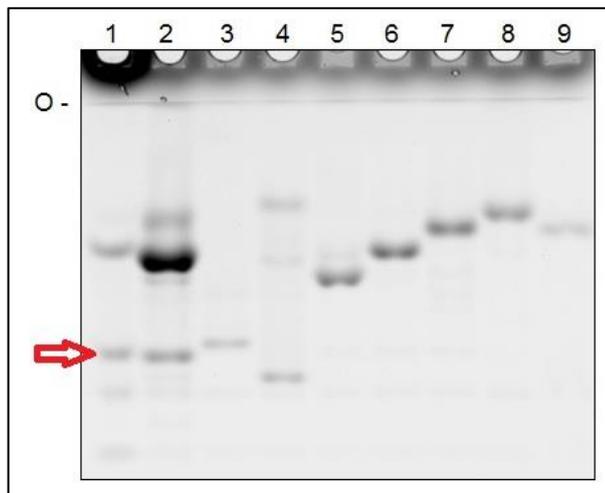
Fração	Açúcar Total (%)	Ácido Urônico (%)	Sulfato (%)	Proteína (%)	Fenólicos (%)	Razão U/A	Razão S/A
DPB	36,8 ± 0,05	12,17 ± 0,009	4,29 ± 0,002	n.d	n.d	0,31	0,26
DPB $\beta$ -elim	84,86 ± 0,01	19,63 ± 0,02	5,00 ± 0,004	n.d	n.d	0,21	0,13
DPB despig	36,5 ± 0,04	13,12 ± 0,009	2,94 ± 0,001	n.d	n.d	0,33	0,18
DPB despig $\beta$ -elim	78,62 ± 0,06	24,63 ± 0,039	10,63 ± 0,006	n.d	n.d	0,29	0,30

Fração DPB e fração DPBdespig: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína – a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente. Fração DPB  $\beta$ -elim e fração DPBdespig  $\beta$ -elim: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente, modificadas quimicamente por  $\beta$ -eliminação.n.d: não detectável. Razão S/A: razão entre o conteúdo de sulfato e açúcar total. Razão U/A: razão entre o conteúdo de ácido urônico e açúcar total.

Nota-se que após  $\beta$ -eliminação o teor de açúcar total (84,86% para DPB  $\beta$ -elim e 78,62% para DPBdespig  $\beta$ -elim), ácido urônico (19,63% para DPB  $\beta$ -elim e 24,63% para DPBdespig  $\beta$ -elim) e sulfato (5,00% para DPB  $\beta$ -elim e 10,63% para DPBdespig  $\beta$ -elim) aumentaram.

#### 4.3.1.1.2 Composição monossacarídica.

A composição monossacarídica das frações DPB e DPBdespig foi avaliada pela FACE após  $\beta$ -eliminação. Os resultados do eletrofluorograma são apresentados na Figura 33.



**FIGURA 33. Eletrofluorograma no sistema Tris-Glicina-Borato pH dos monossacarídeos das frações DPB e DPBdespig modificadas por  $\beta$ -eliminação.** Frações analisadas em gel de acrilamida-bisacrilamida 25% marcadas com fluoróforo 2-aminoacridona (AMAC). 1: Fração DPB  $\beta$ -elim; 2: Fração DPBdespig  $\beta$ -elim; 3: Ácido galacturônico; 4: Ácido glucurônico; 5: Galactose; 6: Glucose; 7: Manose; 8: Ramnose; 9: Xilose. O: origem.

Analisando o eletrofluorograma podemos observar que DPBdespig  $\beta$ -elim apresentou bandas com migração correspondente ao perfil dos padrões de ramnose, glucose e galactose, semelhante ao observado para a fração DPBdespig (Figura 19). Porém, a fração DPB  $\beta$ -elim apresentou bandas correspondentes apenas a ramnose e glucose, diferente do observado para DPB (Figura 19).

Além disso, a banda indeterminada entre o ácido glucurônico e galacturônico observada nas frações DPB e DPBdespig (Figura 19) manteve-se presente no eletrofluorograma das frações  $\beta$ -eliminadas (seta em vermelho na Figura 33).

Após a densitometria do eletrofluorograma, a porcentagem relativa dos monossacarídeos das frações DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim foram calculadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 16.

**Tabela 16. Porcentagem relativa de monossacarídeos das frações DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim determinada por FACE em tampão tris-Glicina-borato pH 8,3.**

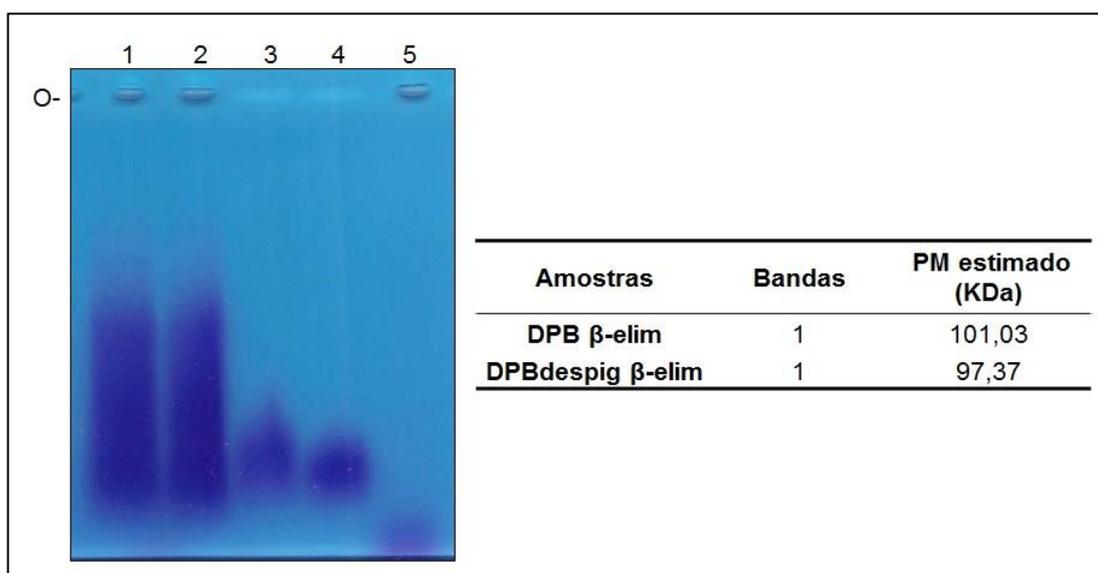
Fração	% Relativa dos monossacarídeos identificados			
	Ramnose	Glucose	Galactose	Banda indeterminada
DPB $\beta$ -elim	5,51	62,15	-	32,34
DPBdespig $\beta$ -elim	12,88	74,08	2,53	10,51

Fração DPB  $\beta$ -elim e fração DPBdespig  $\beta$ -elim: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente, modificadas quimicamente por  $\beta$ -eliminação.

Podemos observar que, a glucose continua como o monossacarídeo majoritário em ambas frações (62,15% para DPB  $\beta$ -elim e 74,08% para DPBdespig  $\beta$ -elim). Além da glucose, DPB  $\beta$ -elim é constituída de 5,51% de ramnose e 32,24% de um monossacarídeo que migrou entre o ácido glucurônico e galacturônico (banda não identificada). Já DPBdespig  $\beta$ -elim é constiutida por 12,88% de ramnose e 2,53% de galactose, além dos 10,51% da banda indeterminada com migração entre os ácidos urônicos. Dessa forma, podemos notar que apenas DPB apresentou composição monossacarídica diferente após  $\beta$ -eliminação.

#### 4.3.1.1.3 Peso molecular modal.

O PM modal das frações DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim foram estimados por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE. Os resultados são apresentados na Figura 34.

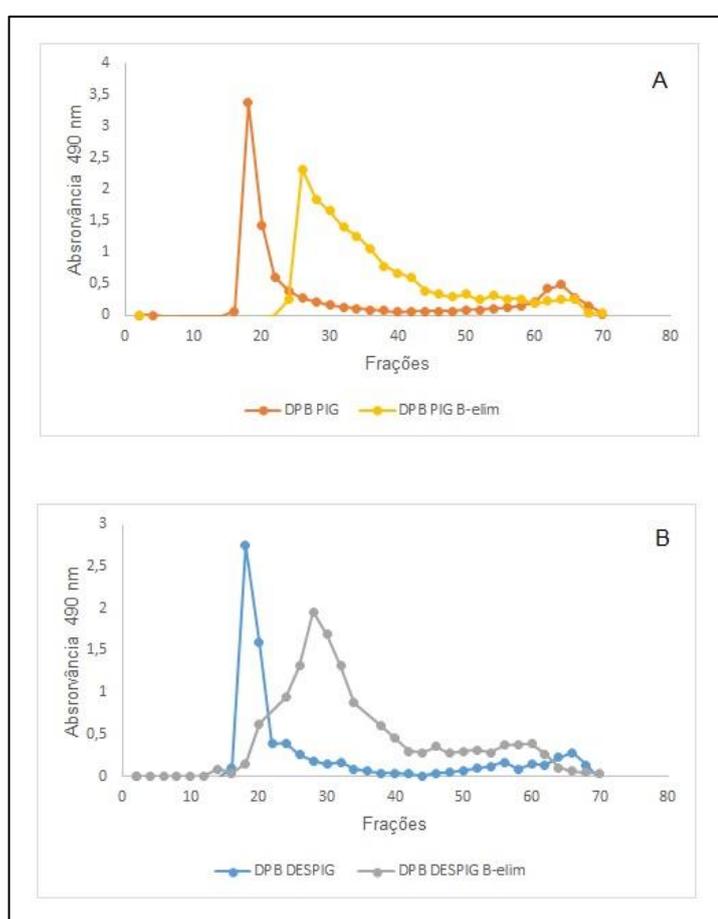


**Figura 34. Gel de agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) pH 8,3 para peso molecular modal das frações DPB e DPBdespig modificadas por  $\beta$ -eliminação.** Frações analisadas em gel de agarose 1% coradas com azul de toluidina 0,1%. 1: Fração DPBdespig  $\beta$ -elim; 2: Fração DPB  $\beta$ -elim; 3: Condroitim-6-Sulfato (67KDa); 4: Condroitim-4-sulfato (26KDa); 5: Dexam sulfato (8KDa). O: origem.

Após a reação de  $\beta$ -eliminação observamos alterações significativas no PM modal estimado por gel de agarose 1% em tampão TBE. As frações  $\beta$ -eliminadas apresentaram a polidispersão no PM variando entre 242,5 KDa e 13,22 KDa. Além disso, podemos observar na Figura 34, a presença de uma banda única nas frações

$\beta$ -eliminadas diferente do observado na fração DPB (Figura 20). O PM estimado para essas frações foi de 101,03 KDa para DPB  $\beta$ -elim e 97,37 KDa para DPBdespig  $\beta$ -elim, valores próximos entre si, e ambos considerados de alto PM.

A análise das frações DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim na cromatografia de gel filtração corrobora com o resultado do gel de agarose 1% em tampão TBE, como apresentado na Figura 35, uma vez que, tanto a DPB quanto DPBdespig tiveram o pico da fração 20 deslocado para próximo da fração 30, sugerindo uma diminuição do PM modal após  $\beta$ -eliminação. Além disso, o pico observado entre a fração 60 e 70 não é observado nas frações  $\beta$ -eliminadas.

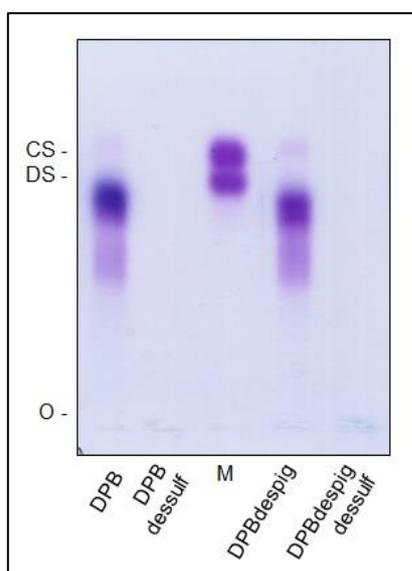


**FIGURA 35.** Perfil cromatográfico em coluna de gel filtração *Q-Sephadex G-200* das frações DPB e DPBdespig modificadas por  $\beta$ -eliminação. Frações eluídas com ácido acético 0,05M em 70 frações de 1 mL (fluxo 0,04 mL/min).

#### 4.3.2 Dessulfatação.

Com o intuito de confirmar a presença de sulfato nos polissacarídeos extraídos, as frações DPB e DPBdespig foram submetidas a dessulfatação, como descrito em

Métodos 3.2.5.2. As frações dessulfatadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão PDA. Os resultados estão apresentados na Figura 36.



**FIGURA 36. Eletroforese em gel de agarose em tampão acetato de 1,3- diaminopropano (PDA) 0,05 M, pH 9,0 das frações DPB e DPBdespig modificadas por dessulfatação.** Alíquotas das frações (10 mg/mL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,5% e corados com azul de toluidina, como descrito em Métodos. Fração DPB, fração DPB dessulf, fração DPBdespig e fração DPBdespig dessulf. M: mistura padrão de CS e DS (5 µg de cada). O: origem.

Podemos notar na Figura 36, que as frações DPB dessulf e DPBdespig dessulf não foram observadas no gel de agarose 0,5% em tampão PDA após coloração com azul de toluidina, indicando a ausência de grupamento sulfato nos polissacarídeos.

A Tabela 17 apresenta a caracterização química das frações DPB e DPBdespig antes e após dessulfatação.

**TABELA 17. Caracterização química das frações DPB e DPBdespig antes e após modificação por dessulfatação.**

Fração	Açúcar Total (%)	Ácido Urônico (%)	Sulfato (%)	Proteína (%)	Fenólicos (%)	Razão U/A	Razão S/A
DPB	36,8 ± 0,05	12,17 ± 0,009	4,29 ± 0,002	n.d	n.d	0,31	0,26
DPB dessulf	47,11 ± 0,03	14,46 ± 0,02	3,33 ± 0,001	0,32	n.d	0,28	0,16
DPB despig	36,5 ± 0,04	13,12 ± 0,009	2,94 ± 0,001	n.d	n.d	0,33	0,18
DPB despig dessulf	49,49 ± 0,007	15,61 ± 0,03	3,17 ± 0,001	0,91	n.d	0,29	0,14

Fração DPB e fração DPBdespig: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 - lise celular acompanhada de proteólise com papaína – a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente. Fração DPB dessulf e fração DPBdespig dessulf: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente, modificadas quimicamente por dessulfatado. n.d: não detectável. Razão S/A: razão entre o conteúdo de sulfato e açúcar total. Razão U/A: razão entre o conteúdo de ácido urônico e açúcar total.

Analisando os resultados, podemos observar que o teor de sulfato não diminuiu tanto como observado no gel de agarose em tampão PDA (3,33% para DPB dessulf e 3,17% DPBdespig dessulf). O teor de açúcar total aumentou após dessulfatação (47,11% para DPB dessulf e 49,49% para DPBdespig dessulf) assim como o ácido urônico (14,46% para DPB dessulf e 15,61% para DPBdespig dessulf). Dessa forma, a razão entre sulfato e açúcar total foi menor para as frações dessulfatadas. E a razão entre ácido urônico e açúcar total não apresentou uma diferença significativa.

#### **4.3.3 Caracterização espectroscópica das frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente por $\beta$ -eliminação e dessulfatação.**

As frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente foram submetidas a análises espectroscópicas de Raman, Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em estado sólido (CP-MAS), com o intuito de buscar as similaridades e diferenças entre as frações antes e após modificação química que possam auxiliar na caracterização estrutural dos polissacarídeos sulfatados extraídos de *Spirulina sp*.

Os resultados dos espectros de Raman para as frações DPB, DPB  $\beta$ -elim e DPB dessulf estão apresentados na Figura 37, e para DPBdespig, DPBdespig  $\beta$ -elim e DPBdespig dessulf na Figura 38.

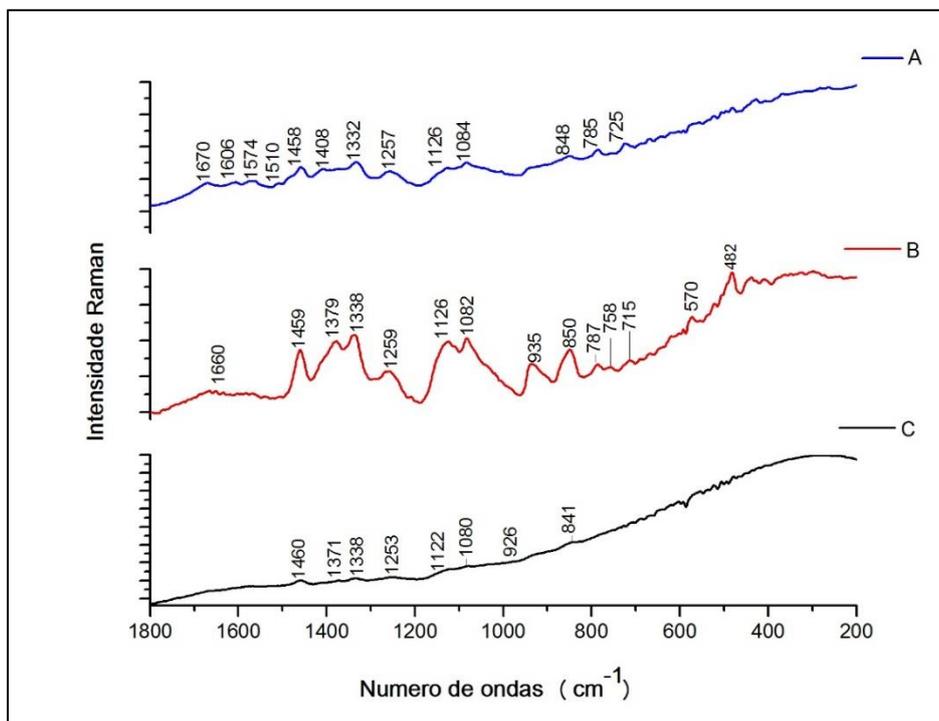


FIGURA 37. Espectros de Raman das frações DPB (A), DPB  $\beta$ -elim (B) e DPB dessulf (C).

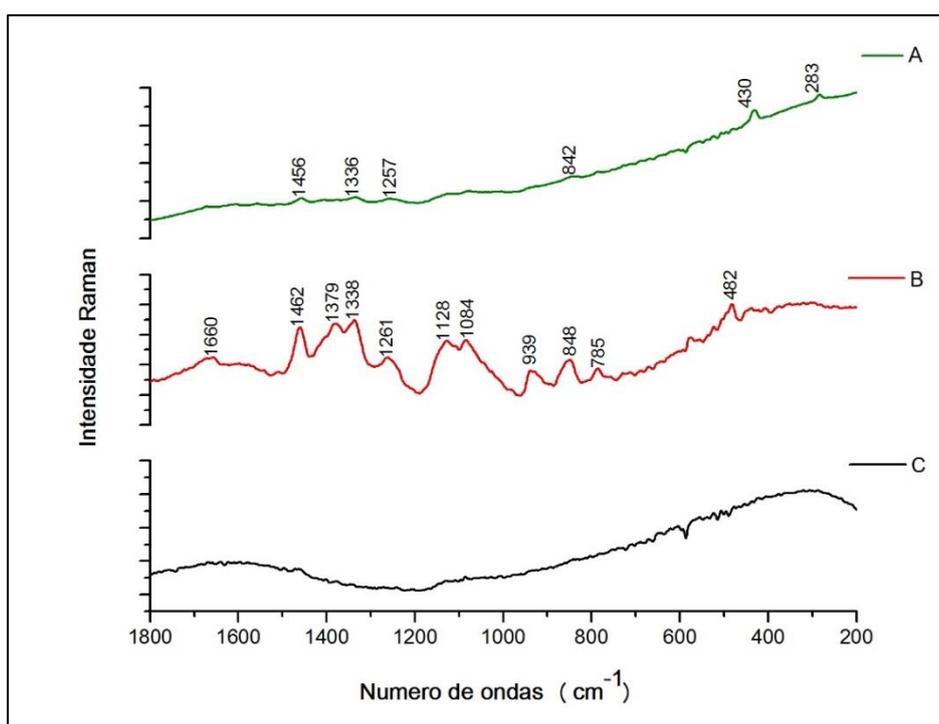


FIGURA 38. Espectros de Raman das frações DPBdespig (A), DPBdespig  $\beta$ -elim (B) e DPBdespig dessulf (C).

Podemos observar que os espectros das frações  $\beta$ -eliminadas apresentam bandas mais intensas em relação as DPB e DPBdespig, corroborando com a eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão PDA e as dosagens químicas. A técnica espectroscópica de Raman não foi eficiente para as frações submetidas a dessulfatação, porém para DPB dessulf ainda foi possível identificar algumas bandas.

A Tabela 18 apresenta as atribuições as bandas identificadas nos espectros de Raman das frações DPB e DPBdespig antes e após modificações químicas.

TABELA 18. Bandas dos espectros do Raman das frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente.

Bandas Fração (cm <sup>-1</sup> )						Atribuições as bandas	Referências
DPB	DPB β-elim	DPB dessulf	DPB despig	DPB despig β-elim	DPB despig dessulf		
1458	1459	1460	1456	1462	n.d	CH <sub>2</sub>	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996
1408					n.d	sim COO <sup>-</sup>	
	1379	1371		1379	n.d	CH <sub>3</sub>	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971
1332	1338	1338	1336	1338	n.d	HCC, HCO, COH do anel de piranose	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996
1257	1259	1253	1257	1261	n.d	ass S=O	PIELLESZ, BINIAS, PALUCH, 2011
1126	1126	1122		1128	n.d	CO, CC, flexão de CO	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996
1084	1082	1080		1084	n.d	COH	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971
						sim O=S=O	PIELLESZ, BINIAS, PALUCH, 2011
	935	926		939	n.d	COH da cadeia do carboidrato	PIELLESZ, BINIAS, PALUCH, 2011
848	850	841	842	848	n.d	flexão C-O-S	PIELLESZ, BINIAS, PALUCH, 2011
785	787 758			785			VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996
725	715		430	576	n.d	Esqueleto do carboidrato	VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996
430	570		283	482			
	482						

Fração DPB e DPBdespig: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente. Fração DPB β-elim e DPBdespig β-elim: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 modificadas quimicamente por β-eliminação. Fração DPB dessulf e DPBdespig dessulf: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 modificadas quimicamente por β-eliminação.

A análise dos espectros de IV das frações DPB e suas análogas,  $\beta$ -eliminadas e dessulfatadas, estão apresentadas na Figura 39, enquanto DPBdespig, DPBdespig  $\beta$ -elim e DPBdespig dessulf na Figura 40.

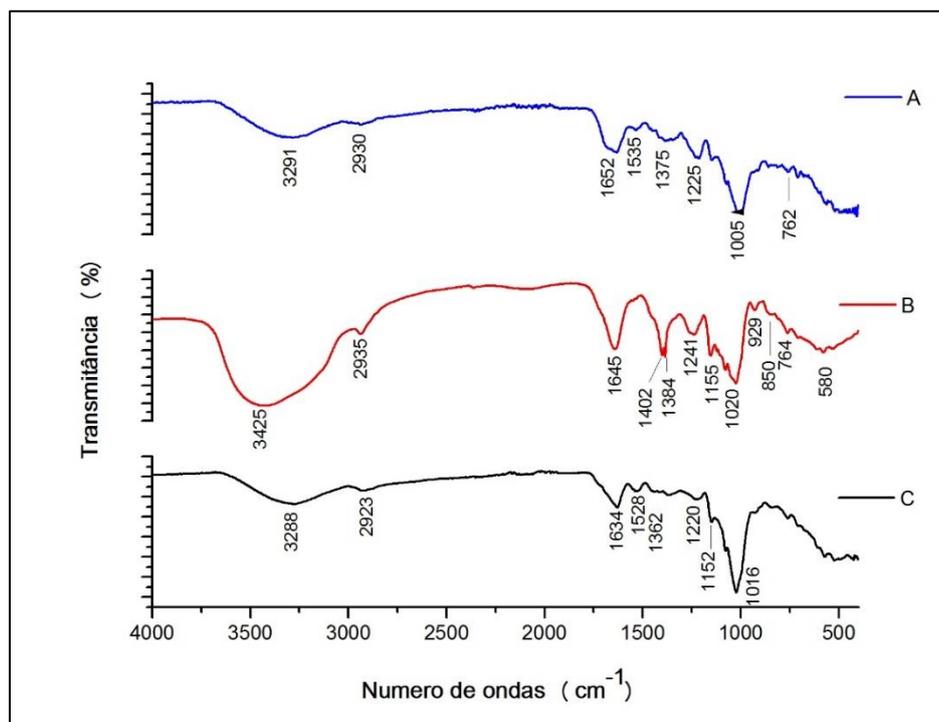


FIGURA 39. Espectros de infravermelho das frações DPB (A), DPB  $\beta$  elim (B) e DPB dessulf (C).

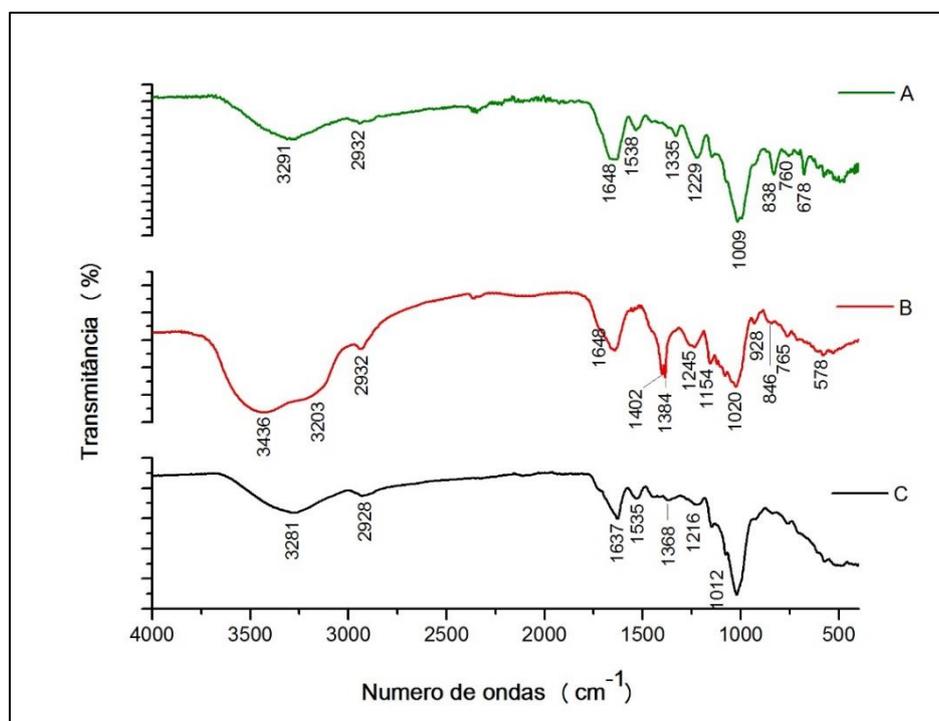


FIGURA 40. Espectros de infravermelho das frações DPBdespig (A), DPBdespig  $\beta$  elim (B) e DPBdespig dessulf (C).

Os espectros de IV corroboram com os resultados observados por espectroscopia de Raman, inclusive quanto a intensidade das bandas dos espectros das frações submetidas a  $\beta$ -eliminação.

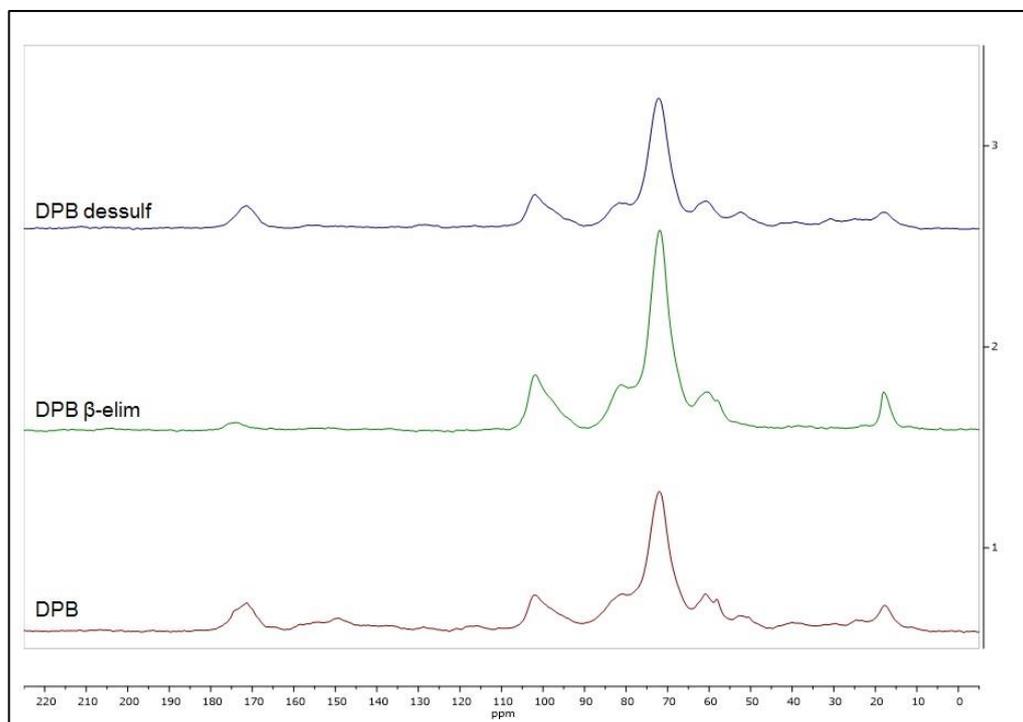
A Tabela 19 apresenta os espectros de IV das frações DPB e DPBdespig e seus análogos modificados quimicamente,  $\beta$ -eliminados e dessulfatados.

TABELA 19. Bandas dos espectros do IV das frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente.

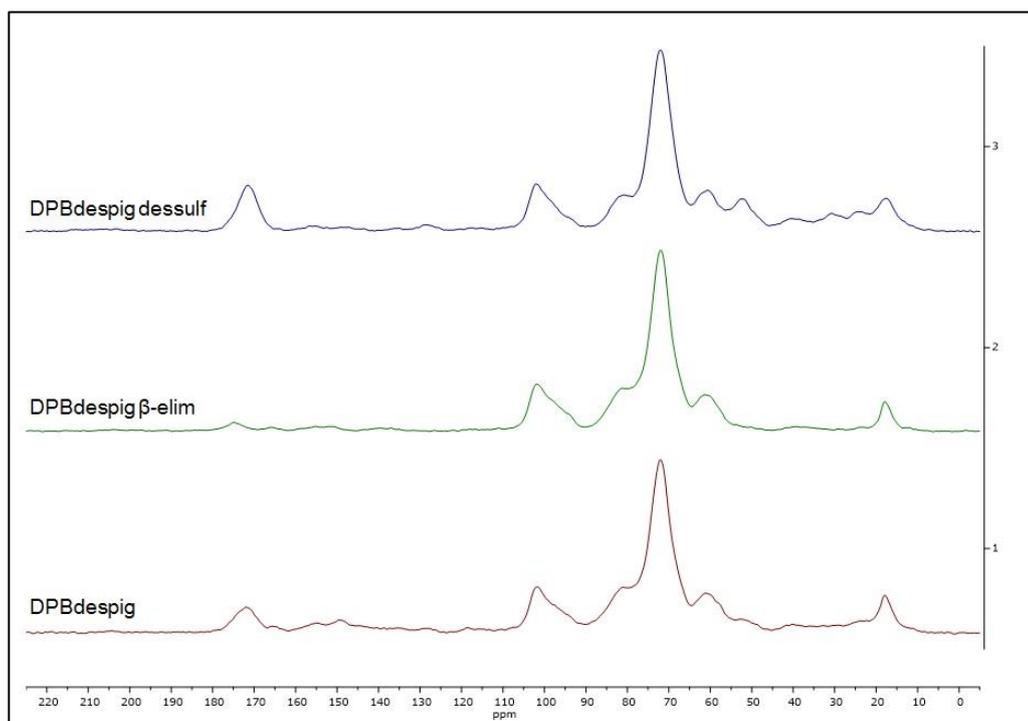
Bandas Fração (cm <sup>-1</sup> )						Atribuições as bandas	Referências
DPB	DPB β-elim	DPB dessulf	DPB despig	DPB despig β-elim	DPB despig dessulf		
3291	3425	3288	3291	3436 3203	3281	OH	ZHANG <i>et al.</i> , 2011b; CAMARA <i>et al.</i> , 2011;
2930	2935	2923	3932	2932	2928	ass CH	MAJDOUB <i>et al.</i> , 2009; MAO <i>et al.</i> , 2009
1652	1645	1634	1648	1648	1637	ass COO <sup>-</sup>	CAMARA <i>et al.</i> , 2011; MAO <i>et al.</i> , 2009
	1402			1402		Flexão O-C=O de ácido urônico	SYNYTSYA e NOVAK, 2014
1375	1384	1362	1335	1384	1368	Flexão OH de ácido urônicos	SYNYTSYA e NOVAK, 2014
1225	1241	1220	1229	1245	1216	ass S=O	MAJDOUB <i>et al.</i> , 2009; MAO <i>et al.</i> , 2009; ZHANG <i>et al.</i> , 2009
1005		1016	1009	1020	1012	C-O-C ciclo osídico	ZHANG <i>et al.</i> , 2011b; CAMARA <i>et al.</i> , 2011; MAJDOUB <i>et al.</i> , 2009
	929			928		CC, CO e flexão COH da cadeia do carboidrato	SYNYTSYA e NOVAK, 2014
	850		838	846		C-O-S posição axial	MAO <i>et al.</i> , 2009
762	764		760	765		Ligações α-D glucanas (1→4)(1→6)	SYNYTSYA e NOVAK, 2014
	580			578		Ligações α-D glucanas (1→3)	

Fração DPB e DPBdespig: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente. Fração DPB β-elim e DPBdespig β-elim: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 modificadas quimicamente por β-eliminação. Fração DPB dessulf e DPBdespig dessulf: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 modificadas quimicamente por β-eliminação.

Os resultados da RMN das frações DPB, DPBdespig e seus análogos  $\beta$ -eliminados e dessulfatados estão apresentados nas Figuras 41 e 42 e, a Tabela 20 apresenta as atribuições aos sinais identificadas nessas Figuras.



**FIGURA 41. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB, DPB  $\beta$ -elim e DPB dessulf.**



**FIGURA 42. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (CP-MAS) das frações DPBdespig, DPBdespig  $\beta$ -elim e DPBdespig dessulf.**

TABELA 20. Sinais de RMN  $^{13}\text{C}$  em estado sólido (CP-MAS) das frações DPB e DPBdespig modificadas quimicamente.

Bandas Fração ( $\text{cm}^{-1}$ )						Atribuições as bandas	Referências
DPB	DPB $\beta$ -elim	DPB dessulf	DPB despig	DPB despig $\beta$ -elim	DPB despig dessulf		
172	174	172	172	175	172	$\text{COO}^-$ ou $\text{C=O}$	CHEN <i>et al.</i> , 2005; UGOALA, NDUKWE, AYO, 2016
102	102	102	102	101	102	C1 (C anomérico)	ZHANG <i>et al.</i> , 2011a
81	82	82	81	82	81	C4	ROBIC <i>et al.</i> , 2009
72	72	72	72	72	72	C2, C3, C5	UGOALA, NDUKWE, AYO, 2016
61	60	61	60	60	61	C6	ROBIC <i>et al.</i> , 2009, ZHANG
58	58		58			C6	<i>et al.</i> , 2011a
		52			52	C6	
18	18	18	18	18	18	$\text{CH}_3$ Ramnose	NEP.e CONWAY, 2010

Fração DPB e DPBdespig: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente. Fração DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 modificadas quimicamente por  $\beta$ -eliminação. Fração DPB dessulf e DPBdespig dessulf: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 modificadas quimicamente por  $\beta$ -eliminação.

Podemos notar que após  $\beta$ -eliminação as bandas atribuídas a C de proteína tornam-se mais largas e, após dessulfatação uma das bandas características de C6 foi deslocada para baixo (o sinal de 58 ppm para 52 ppm).

#### 4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

##### 4.4.1 Atividade anticoagulante.

O Método da USP (Métodos 3.2.7.1) foi realizado como uma triagem para avaliar a atividade anticoagulante das frações DPB, DPBdespig, DPB  $\beta$ -elim, DPBdespig  $\beta$ -elim, DPB dessulf e DPBdespig dessulf.

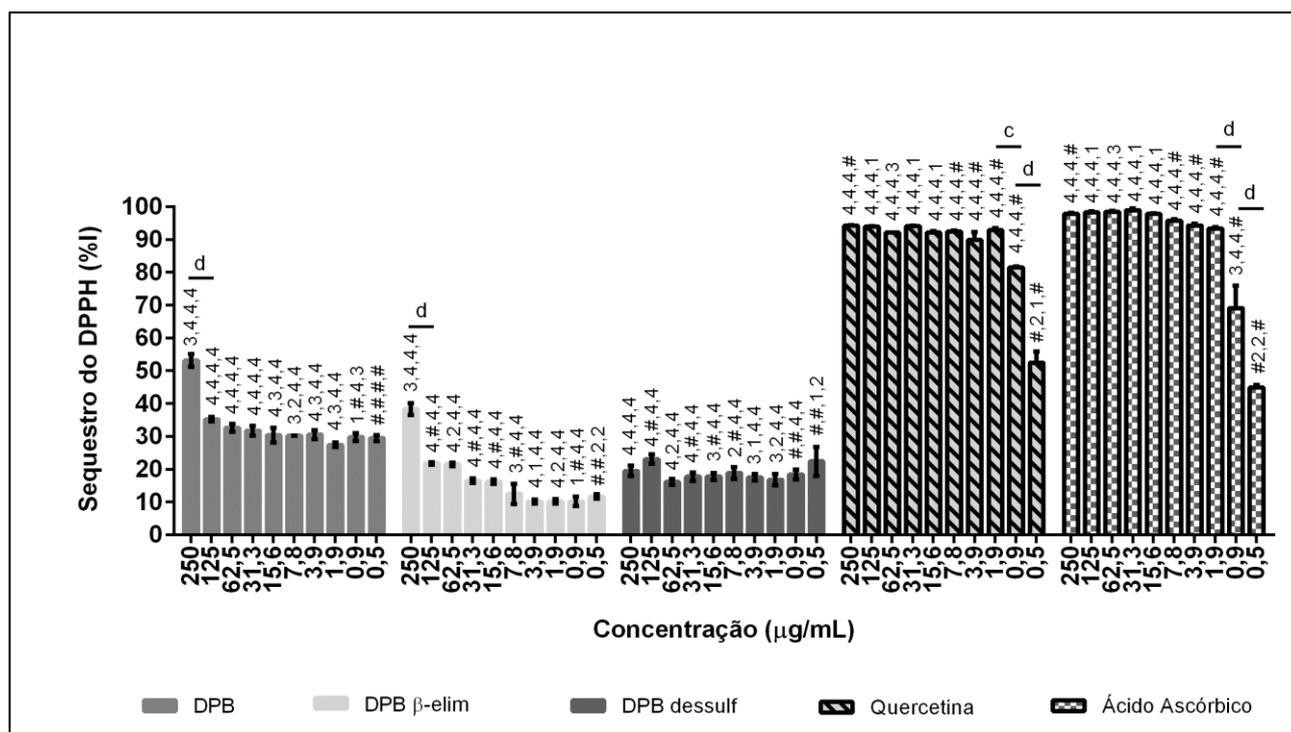
Como já esperado, o controle positivo (heparina de 165 UI - anticoagulante padrão) promoveu a retração do coágulo formado em relação ao controle negativo (plasma citratado). Porém, nenhuma das frações testadas contribuíram para a retração do coágulo.

#### 4.4.2 Atividade antioxidante.

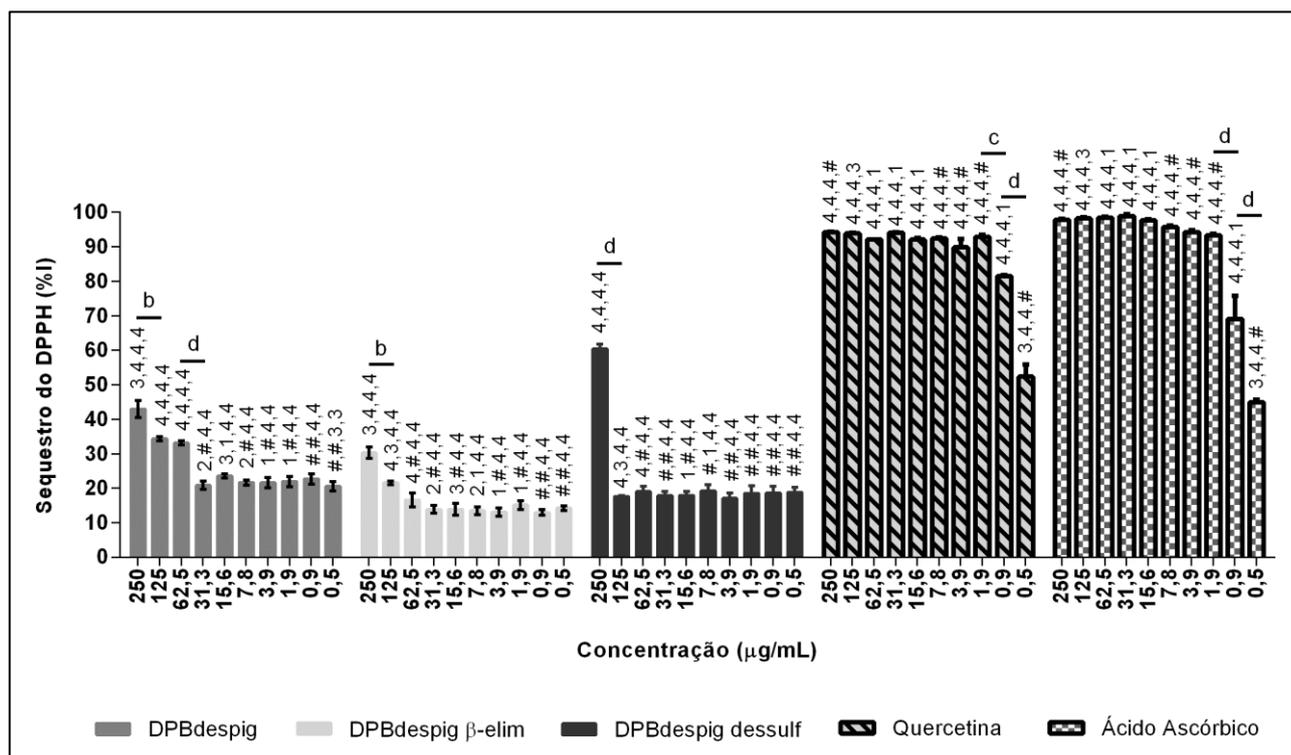
A atividade antioxidante das frações DPB, DPBdespig, DPB  $\beta$ -elim, DPBdespig  $\beta$ -elim, DPB dessulf e DPBdespig dessulf foi avaliada em dois diferentes ensaios *in vitro*: sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico, além da cinética da atividade antioxidante.

##### 4.4.2.1 Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

Os resultados obtidos no teste de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das frações DPB e DPBdespig e, de suas frações  $\beta$ -eliminadas e dessulfatadas, estão apresentados nas Figuras 43 e 44.



**FIGURA 43. Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das frações de polissacarídeos obtida da biomassa seca.** Cada valor representa a média de três determinações  $\pm$  desvio padrão. As diferentes letras a, b, c, d indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes concentrações de uma mesma fração. Diferentes números (1, 2, 3, 4) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a mesma concentração de diferentes frações. # indica a ausência de significância ( $p < 0,05$ ). Fração DPB, fração DPB  $\beta$ -elim e fração DPB dessulf.



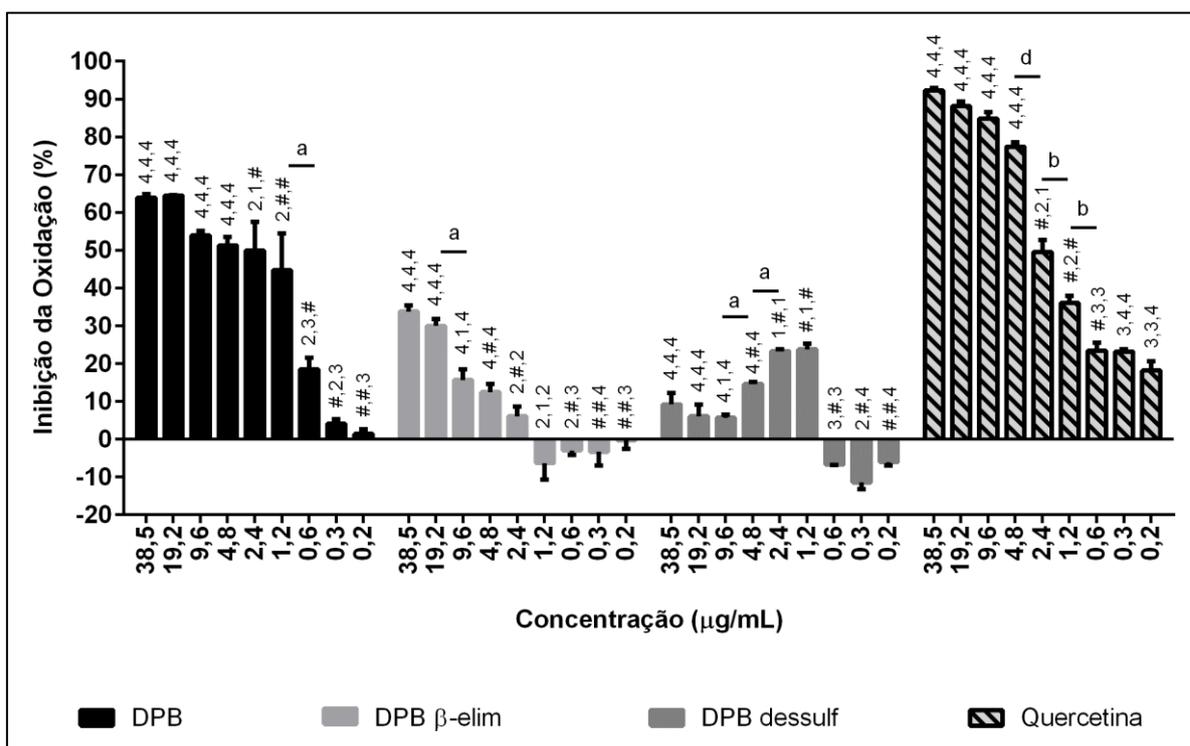
**FIGURA 44. Sequestro do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) das frações de polissacarídeos obtida da biomassa seca despigmentada.** Cada valor representa a média de três determinações  $\pm$  desvio padrão. As diferentes letras a, b, c, d indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes concentrações de uma mesma fração. Diferentes números (1, 2, 3, 4) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a mesma concentração de diferentes frações. # indica a ausência de significância ( $p < 0,05$ ). Fração DPBdespig, fração DPBdespig  $\beta$ -elim e fração DPBdespig dessulf.

Analisando a Figura 43 nota-se que, a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH das frações DPB, DPB  $\beta$ -elim e DPB dessulf foi de 53,15%, 38,26 % e 19,46%, respectivamente, quando utilizada a maior concentração (250  $\mu\text{g/mL}$ ). As demais concentrações analisadas (125 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram menor atividade antioxidante, em torno de 30% para a fração DPB e de 20-10% para DPB  $\beta$ -elim, com exceção da fração DPB dessulf, a qual manteve atividade antioxidante próxima a inicial (19%).

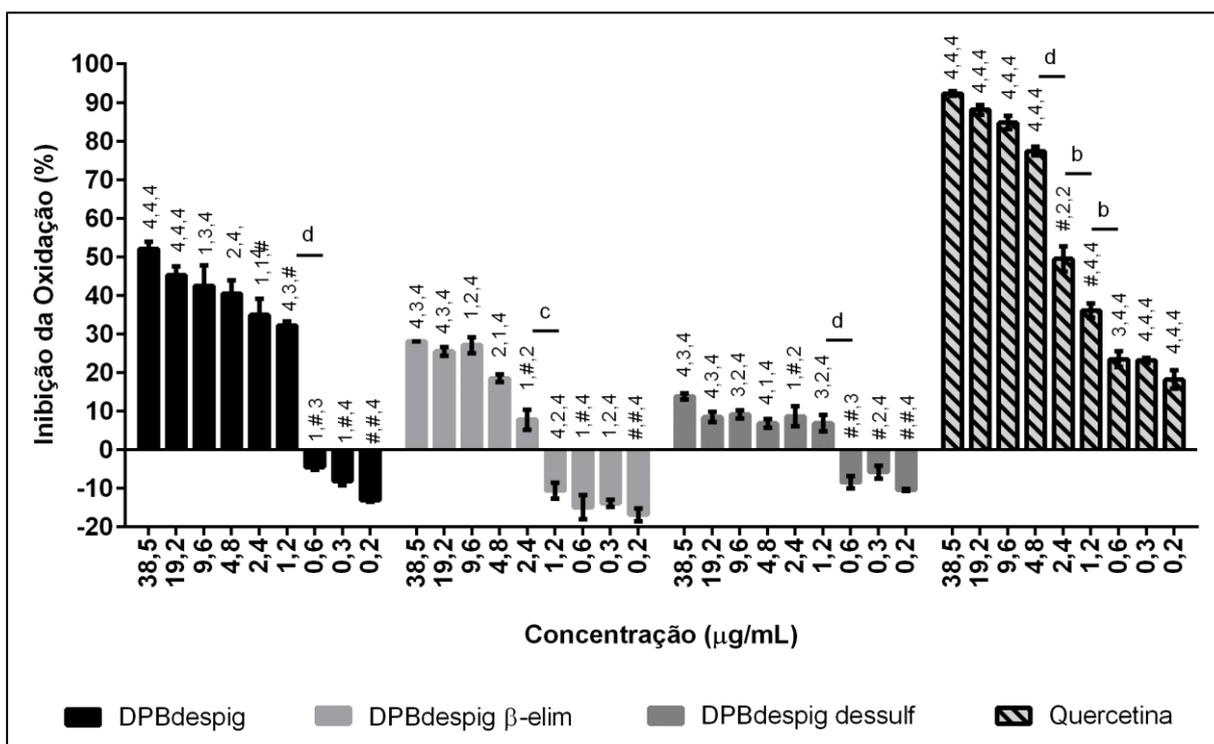
Para as frações obtidas da biomassa despigmentada (Figura 44) podemos observar que na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  foi a fração DPBdespig dessulf que apresentou maior atividade antioxidante (60,42%), seguida pelas frações DPBdespig (42,96%) e DPBdespig  $\beta$ -elim (30,30%). A atividade antioxidante das frações mostrou decair com a diminuição da concentração testada, principalmente a fração DPBdespig dessulf, a qual a queda foi brusca a partir de 125  $\mu\text{g/mL}$  (cerca de 20% de Inibição).

#### 4.4.2.2 Oxidação do sistema $\beta$ -caroteno-ácido linoleico e cinética da atividade antioxidante.

Os resultados da atividade antioxidante avaliada pela oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico das frações DPB, DPB  $\beta$ -elim e DPB dessulf estão apresentados na Figura 45 e das frações DPBdespig, DPBdespig  $\beta$ -elim e DPBdespig dessulf na Figura 46.



**FIGURA 45. Inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico das frações de polissacarídeos obtida da biomassa seca.** Cada valor representa a média de três determinações  $\pm$  desvio padrão. As diferentes letras a, b, c, d indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes concentrações de uma mesma fração. Diferentes números (1, 2, 3, 4) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a mesma concentração de diferentes frações. # indica a ausência de significância ( $p < 0,05$ ). Fração DPB, fração DPB  $\beta$ -elim e fração DPB dessulf.



**FIGURA 46.** Inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico das frações de polissacarídeos obtida da biomassa seca despigmentada. Cada valor representa a média de três determinações  $\pm$  desvio padrão. As diferentes letras a, b, c, d indicam uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes concentrações de uma mesma fração. Diferentes números (1, 2, 3, 4) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a mesma concentração de diferentes frações. # indica a ausência de significância ( $p < 0,05$ ). Fração DPBdespig, fração DPBdespig  $\beta$ -elim e fração DPBdespig dessulf.

Podemos observar na Figura 45 que a fração DPB apresentou melhor atividade antioxidante (63,95%), seguida, pela fração DPB  $\beta$ -elim (33,64%), quando ambas avaliadas na maior concentração testada (38,5  $\mu\text{g/mL}$ ). No entanto, a fração DPB dessulf (9,22%) não apresentou boa atividade antioxidante no sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico.

A fração a partir da biomassa despigmentada, DPB despig, também apresentou boa atividade antioxidante (50,09%) na concentração de 38,5  $\mu\text{g/mL}$ . Porém, a atividade diminuiu após as modificações químicas do polissacarídeo, 28,07% DPBdespig  $\beta$ -elim e 13,86% DPBdespig dessulf.

Nota-se que em baixas concentrações (0,6 a 0,2  $\mu\text{g/mL}$ ) as frações apresentaram atividade pró-oxidante, representada pela porcentagem de inibição negativa, com exceção da amostra DPB, a qual se mostrou antioxidante em todas as concentrações testadas.

Dessa forma, a fração DPB e DPBdespig apresentaram melhor atividade antioxidante a partir do método de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico.

A determinação do decaimento da absorbância, devido a oxidação do  $\beta$ -caroteno, com o tempo de reação permitiu o cálculo dos valores de F1 e F2 (Tabela 21), dados adicionais sobre a atividade antioxidante das frações.

**TABELA 21. Parâmetros cinéticos (F1 e F2) do potencial antioxidante no sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico.**

Fração $\mu\text{g/mL}$		Quercetina	DPB	DPB $\beta$ -elim	DPB dessulf	DPB despig	DPB despig $\beta$ -elim	DPB despig dessulf
		<b>F1</b>	38,5	0,05	0,27	0,43	0,68	0,36
	19,2	0,06	0,25	0,57	0,71	0,35	0,53	0,69
	9,6	0,11	0,28	0,81	0,72	0,44	0,69	0,69
	4,8	0,12	0,32	0,83	0,60	0,38	0,80	0,73
	2,4	0,64	0,33	0,93	0,53	0,43	0,90	0,67
	1,2	0,59	0,36	1,01	0,54	0,50	1,20	0,71
	0,6	0,87	0,70	1,04	0,88	0,87	1,24	0,71
	0,3	0,68	0,70	1,04	0,89	0,91	1,31	0,85
	0,2	0,72	0,71	0,99	0,95	0,91	1,15	0,86
<b>F2</b>	38,5	0,30	0,75	0,87	1,86	0,96	0,82	1,70
	19,2	0,14	0,73	0,80	1,86	1,28	0,84	1,78
	9,6	0,15	1,06	0,91	1,79	1,56	0,88	1,75
	4,8	0,25	1,14	0,93	1,84	1,41	0,97	1,74
	2,4	0,84	1,13	1,02	1,67	1,52	1,01	1,72
	1,2	0,75	1,21	1,06	1,60	1,64	1,02	1,72
	0,6	1,11	1,07	0,98	1,34	0,75	1,02	2,17
	0,3	0,93	1,89	0,97	1,07	1,47	0,96	0,75
	0,2	0,94	1,34	0,95	2,54	1,90	0,97	1,06

Fração DPB e DPBdespig: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 a partir da biomassa de *Spirulina sp* pigmentada e despigmentada, respectivamente. Fração DPB  $\beta$ -elim e DPBdespig  $\beta$ -elim: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 modificadas quimicamente por  $\beta$ -eliminação. Fração DPB dessulf e DPBdespig dessulf: polissacarídeos obtidos pela Condição 4 modificadas quimicamente por  $\beta$ -eliminação.

A eficiência do antioxidante é tanto maior quanto mais distante os valores de F1 e F2 se encontrarem do valor de 1,0. Além disso, os valores de F1 estão relacionados a eficiência do antioxidante em bloquear mecanismos primários de oxidação, como a interação com radicais peróxidos formados, enquanto os valores de F2 correlacionam-se com mecanismos secundários, interferindo nas reações de formação de produtos secundários da reação de oxidação.

Dessa forma, podemos observar que diferente da Quercetina, que tem atividade antioxidante sobre mecanismos primários e secundários, as frações de

polissacarídeos agem melhor sobre os mecanismos primários de oxidação, principalmente, as frações DPB e DPBdespig, que apresentaram menores valores de F1.

## 5 DISCUSSÃO.

Os polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo complexo de macromoléculas com uma vasta gama de propriedades biológicas já descritas (SENNI *et al.*, 2011). Estudos tem relatado algumas dessas atividades para os polissacarídeos sulfatados obtidos da microalga *Spirulina sp* como: atividade antitumoral, antiviral, anticoagulante e antioxidante (LEE *et al.*, 2001; MAJDOUB *et al.*, 2009; OH *et al.*, 2011; KURD e SAMAVATI, 2015). A relação entre a estrutura e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados ainda não está claramente estabelecida. No entanto, algumas características estruturais têm se mostrado necessárias para as atividades, dentre elas o teor e posição de grupos sulfato que interferem diretamente no arranjo estrutural do polissacarídeo, além, da composição monossacarídica, ligações glicosídicas e peso molecular (LEE *et al.*, 2001; TOIDA, CHAIDEDGUMJORN, LIBHARDT, 2003; COSTA *et al.*, 2010; MUTHANA, CAMPBELL e GILDERSLEEVE, 2012). Assim, tendo conhecimento das inúmeras aplicações biológicas dos polissacarídeos sulfatados, buscou-se propor a melhor condição de obtenção de polissacarídeos sulfatados e explorar sua estrutura para então, iniciar o estudo da relação atividade biológica e estrutura.

Conforme descrito na literatura, em geral, polissacarídeos da microalga *Spirulina sp* são obtidos a partir da extração com água fervente em curtos períodos de tempo (HAYASHI e HAYASHI, 1996; LEE *et al.*, 1998; CHAIKLAHAN *et al.*, 2013). Chaiklahan *et al.* (2013) realizou a extração com água a 95°C por 2 horas e obtiveram rendimento de polissacarídeos igual a 8,3%. No presente trabalho, realizamos a extração aquosa, porém em temperatura menor (60°C) e sob ultrassom a 40 kHz. O rendimento de polissacarídeos extraídos (8,28% na Tabela 1) foi semelhante àquele obtido por Chaiklahan *et al.* (2013), sugerindo que a cavitação acústica gerada pelo ultrassom aplicada a extração de polissacarídeos é tão eficaz quanto a extração sob altas temperaturas.

Já no estudo realizado por OH *et al.* (2011), utilizando um processo de extração com água a 60°C sob ultrassom 60 kHz por 30 minutos, os autores obtiveram rendimento de 19,3%. O menor rendimento obtido nas condições testadas (8,28%, Tabela 1) pode ser devido a menor frequência do ultrassom e ao menor tempo em que a biomassa foi submetida a extração dos polissacarídeos.

A inclusão de NaOH 3% pH 12 à condição de extração anteriormente mencionada (ultrassom 40 kHz e incubação 60°C/1 hora) não melhorou o rendimento de polissacarídeos extraídos (2,27%, Tabela 1). Em trabalho realizado com *Ulva lactuca* foi observado um rendimento de 17,57% de polissacarídeos sulfatados ao se utilizar a combinação NaOH 2%, 90°C, ultrassom e 5 horas de incubação para o processo de extração (TIAN *et al.*, 2015). Nota-se que a temperatura e o tempo de extração foram superiores ao utilizado neste trabalho, o que pode justificar o baixo rendimento da extração alcalina.

Estudos vem utilizando a proteólise como uma das etapas no processo de obtenção de polissacarídeos a partir de algas (MELO *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2010). Sabendo-se da complexidade da parede celular das cianobactérias, foi aplicado o uso dessa etapa ao processo de extração de polissacarídeos da microalga *Spirulina sp.*, de modo que, as frações que foram submetidas a esse processo de extração apresentaram um notável aumento de rendimento (Tabela 2, 3 e 4).

A melhora na obtenção de polissacarídeos sulfatados, após adição de proteólise a extração, também foi observada ao comparamos o perfil eletroforético das frações obtidas por extração aquosa e alcalina (Figura 13) com as frações obtidas após proteólise (Figuras de 14 - 16), onde notamos que as frações submetidas a proteólise apresentaram coloração violácea mais intensa. Além disso, quando foi adicionado ao processo de proteólise, a lise celular utilizando o disruptor de células, a coloração violácea foi ainda mais visível, sugerindo um melhor rendimento de polissacarídeos sulfatados.

As análises químicas (Tabela 5, 10, 15 e 17) demonstraram que em nenhuma das frações analisadas foi detectada proteínas. Em trabalhos anteriores foram encontrados teores de proteína relativamente altos (em torno de 55%) (RETCHEER *et al.*, 2006; TRABELSI *et al.*, 2009). Essa diferença pode ser atribuída, principalmente, a condição de extração, visto que, em nosso trabalho foi utilizado a proteólise como processo de extração, o que até o momento não havia sido empregado para a obtenção de polissacarídeos da microalga *Spirulina sp.*

O teor de sulfato dos polissacarídeos das frações DPB (4,29%) foi próximo ao teor observado para exopolissacarídeos de *Spirulina sp.* obtidos por extração aquosa e a partir da filtração do meio de cultivo, 5,7% e 5,0%, respectivamente (LEE *et al.*, 1998; FILALI *et al.*, 1993). No entanto, a fração DPBdespig apresentou um teor menor (2,94%) quando comparada a DPB. Quanto ao teor de ácido urônico as frações DPB

e DPBdespig (Tabela 5) apresentou teores próximos ao relatado por Lee *et al.* (1998) (16,5%) e inferiores a Filali *et al.* (1993) (40,0%). O teor de açúcar total foi semelhante (em torno de 36%) para ambas as frações.

Assim, podemos sugerir que as diferenças encontradas entre o rendimento, teor de açúcar total, ácido urônico, sulfato e proteínas para as frações DPB e DPBdespig, e os dados da literatura, podem estar relacionadas sobretudo a condição de extração utilizada para a obtenção dos polissacarídeos sulfatados de *Spirulina sp.*

Quando a fração DPB foi eluída em cromatografia de *Q-Sepharose*, obteve-se as frações DPB 2,0M e 3,0M. Comparando-se o perfil destas duas frações é possível notar que embora a DPB 2,0M apresente teor de açúcar total (78,58%) maior do que a DPB 3,0M (26,01%), a razão entre sulfato e açúcar total (0,10) é menor do que aquela observada para DPB 3,0M (0,81), sugerindo que esta fração apresenta um polissacarídeo mais sulfatado (Tabela 10). Perfil semelhante entre estas frações é notado para a razão entre ácido urônico e açúcar total. Estes comportamentos justificam a menor migração eletroforética da DPB 3,0M na eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão PDA 0,05M, pH 9,0, visto que, o perfil eletroforético de diferentes polissacarídeos sulfatados se dá pela interação dos grupamentos sulfato com as cargas positivas da diamina do tampão (DIETRICH e DIETRICH, 1976).

Como apresentados na Tabela 15 as frações submetidas a  $\beta$ -eliminação apresentaram um aumento nos teores de açúcar total, sulfato e ácido urônico. Este resultado sugere que a  $\beta$ -eliminação foi capaz de quebrar a ligação entre açúcar e proteína que ainda estariam ligadas aos polissacarídeos, mesmo pós proteólise, deixando-os mais disponíveis as reações. O aumento da intensidade da metacromasia observada para essas frações (Figura 32) corroboram estes dados.

A composição monossacarídica relatada para os polissacarídeos obtidos de *Spirulina sp* podem variar muito, contudo conforme descrito na literatura em geral, a ramnose o constituinte majoritário (LEE *et al.*, 1998; CHAIKLAHAN *et al.*, 2013).

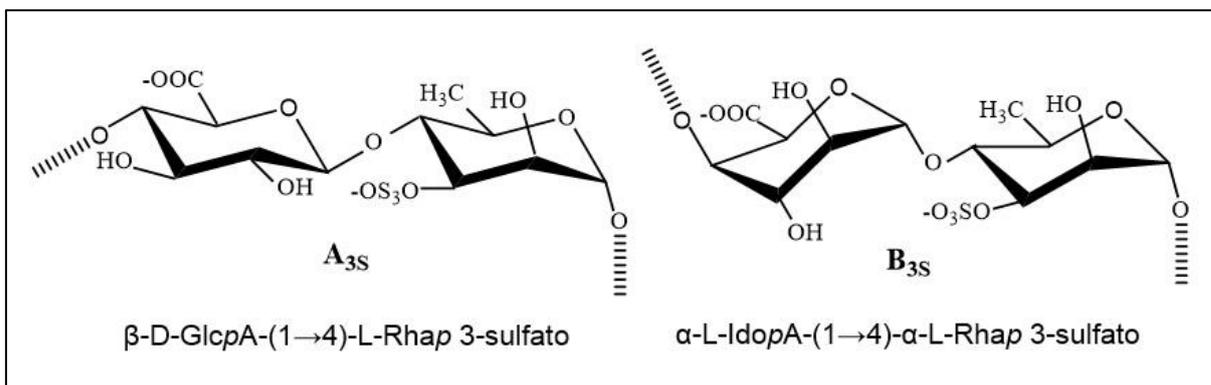
O spirulam obtido por Lee *et al.* (1998) continham ramnose (52,3%), 3-O-metilramnose, ou acofriose, (32,5%), 2,3-di-O-metilramnose (4,4%), 3-O-metilxilose (4,8%), vestígios de outros açúcares neutros (glucose, xilose e arabinose) também foram observados. Em outro estudo, polissacarídeos obtidos por extração aquosa a 90°C por 2 horas apresentaram ramnose (53%), glucose (14%), ribose (10%) e, em menores quantidades (em torno de 5%), galactose, xilose e manose (CHAIKLAHAN *et al.*, 2013).

No entanto, há trabalhos que relatam outros monossacarídeos como constituinte majoritário, como em Trabelsi *et al.* (2009), que observou a presença de nove diferentes unidades monoméricas, incluindo sete açúcares neutros (xilose, galactose, glucose, fucose, arabinose, ramnose e manose) e dois ácidos urônicos (ácido galacturônico e glucurônico) em exopolissacarídeos obtidos por filtração do meio de cultivo de *Spirulina platensis*. Destes, os monossacarídeos majoritários foram fucose, xilose, galactose, glucose e ácido galacturônico (na proporção de 1: 1: 1: 1: 1), a arabinose e a ramnose estavam presentes em pequenas quantidades e apenas traços de manose e ácido glucurônico.

Os polissacarídeos sulfatos da microalga *Spirulina sp* obtidos pela extração aquosa a quente e com etanol 85%, por Baki *et al.* (2013) apresentou o ácido glucurônico como constituinte predominante em todos os extratos, seguido pela galactose e glucose. No entanto, ramnose e arabinose estavam presentes como constituintes minoritários.

Dessa forma, a composição monossacarídica observada pelas frações deste trabalho (Tabelas 6, 11 e 16) está em acordo com o relatado na literatura sendo, quatro monossacarídeos observados glucose, ramnose, galactose e ácido urônico apresentando a glucose como constituinte majoritário. DPB  $\beta$ -elim foi a única fração que não apresentou a galactose em sua composição monossacarídica, sugerindo que durante o processo de  $\beta$ -eliminação a galactose possa ter sido perdida por está mais exposto na cadeia do DPB.

As frações investigadas nesta dissertação apresentaram teor de ácido urônico de 7,80-24,63%, este resultado esta de acordo com o obtido por Lee *et al.* (1998) que demonstrou um teor de ácido urônico de 16,5% para o spirulam. Em 2000, Lee *et al.*, descreveu que o polissacarídeo sulfatado spirulam contem em sua cadeia o ácido aldobiuurônico (Figura 47), com base nesta informação, sugere-se que a banda com migração entre o ácido glucurônico e galacturônico observado pela FACE pode ser esse ácido urônico (Figuras 19, 27 e 33).



**Figura 47: Estrutura ácido aldobiórico.** A<sub>3S</sub>: Tipo A - ácido urônico unida por ligação β (1→4) a uma molécula de ramnose 3-sulfatada; B<sub>3S</sub>: Tipo B - ácido idurônico unida por ligação α (1→4) a uma molécula de ramnose 3-sulfatada. Fonte: Adaptado (WANG, 2014; LAHAYE e ROBIC; 2007).

Chaiklahan *et al.* (2014), usando extração aquosa a quente e precipitação com 2 volumes de etanol, obtiveram polissacarídeos de *Spirulina sp* com pesos moleculares estimados em 212 e 12,6 KDa. A presença de polissacarídeos de alto e baixo peso molecular nas frações DPB, DPBdespig, DPB 2,0M e DPB 3,0M (Figuras 20 e 28) estão em acordo com o demonstrado por estes autores.

Ainda segundo Chaiklahan *et al.* (2014) o peso molecular dos polissacarídeos depende do método de extração e separação utilizados na obtenção do mesmo. Desta forma, Lee *et al.* (1998) isolaram por cromatografia de troca iônica e gel filtração um spirulan com peso molecular estimado em 74,6 KDa. Já os polissacarídeos sulfatados obtidos da filtração do meio de cultivo de *Spirulina* e submetidos a cromatografia em DEAE-*cellulose* exibiram peso molecular estimado em 199 KDa (MAJDOUB *et al.*, 2009). Assim, as frações β-eliminadas (Figura 34) apresentaram peso molecular único e menor do que o observado para as demais frações (Figura 20, 28 e 34).

A espectroscopia de RAMAN reflete interações e estruturas moleculares em geral, além disso, trata-se de um método rápido, não destrutivo e que não necessita de qualquer pré-tratamento químico ou mecânico da amostra a ser analisada, tornando-se uma opção interessante para a análise de polissacarídeos (JELICKA, EDWARDS, OREN, 2014; MAIA *et al.*, 2016).

Até o presente momento não houve relato da utilização desta técnica na análise de polissacarídeos obtidos de *Spirulina sp*. Assim, a análise dos espectros obtidos neste trabalho foi realizada por comparação com dados da literatura de polissacarídeos em geral e os espectros das frações.

Os espectros de Raman para todas as frações investigadas neste trabalho, apresentam bandas que estão de acordo com aquelas descritas em trabalhos prévios, os quais avaliaram cadeia de mono e polissacarídeos (VASKO, BLACKWELL e KOENIG, 1971; MATSHIRO, 1996) demonstrando que a banda em  $1458\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações de  $\text{CH}_2$ ; em  $1337\text{ cm}^{-1}$  a vibrações HCC, HCO e COH dos anéis de piranose; a banda em  $1126\text{ cm}^{-1}$  a vibrações de alongamento de CO e CC e de flexão de COH e; as bandas abaixo de  $785\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a deformações do esqueleto da cadeia do polissacarídeo. Ainda de acordo com Vasko, Blackwell e Koenig (1971) a banda em  $1084\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibrações COH, como também pode ser atribuída a vibrações simétricas  $\text{O}=\text{S}=\text{O}$  segundo Pielesz, Binias e Paluchi (2011), ao analisar a estrutura de fucoidans hidrolisados.

As bandas em torno de  $1380\text{ cm}^{-1}$  e  $920\text{ cm}^{-1}$  presentes tanto nas frações purificadas (Figura 29) quanto nas  $\beta$ -eliminadas (Figura 37 e 38) podem corresponder a vibrações de grupos  $\text{CH}_3$  (VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971) e COH (PIELESZ, BINIAS, PALUCHI, 2011) da cadeia polissacarídica, respectivamente. As bandas em  $1274$  e  $1277\text{ cm}^{-1}$  identificadas nas frações DPB 2,0M e 3,0M podem ser atribuídas a vibrações de  $\text{CH}_2\text{OH}$  de cadeias laterais ou do grupo OH do C anomérico, respectivamente (VASKO, BLACKWELL, KOENIG, 1971).

As bandas em  $1258\text{ cm}^{-1}$  e  $840\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a vibrações assimétricas de  $\text{S}=\text{O}$  e vibrações de flexão de C-O-S na posição axial segundo Pielesz, Binias e Paluchi (2011). Desta forma, nas frações estudadas as bandas identificadas próximas aquelas regiões foram atribuídas a grupos sulfato. A banda em  $1157\text{ cm}^{-1}$  observada em DPB 3,0M foi atribuída a vibrações simétricas  $\text{O}=\text{S}=\text{O}$  uma vez que Matsuhiro (1996) durante estudo com galactanas sulfatadas atribuiu a mesma vibração ( $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ ) para banda em  $1160\text{ cm}^{-1}$ . Após processo de dessulfatação essas bandas apresentaram-se mais largas, ou desapareceram, fato associado à diminuição do espalhamento da luz pela perda dos grupos sulfato.

Ainda segundo Pielesz, Binias e Paluchi (2011), a banda em  $1413\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao grupo  $\text{COO}^-$ , o mesmo grupo relata que tal banda pode sofrer deslocamento. Dessa forma, a banda em  $1408\text{ cm}^{-1}$  identificada na fração DPB pode ser atribuída a  $\text{COO}^-$  presente nos ácidos urônicos do polissacarídeo da fração.

A espectroscopia de infravermelho (IV) procura investigar as vibrações moleculares e das ligações polares entre os diferentes átomos que formam a molécula

(ZHANG *et al.*, 2011b). Dessa forma, a espectroscopia de IV permite complementar as análises espectroscópicas de Raman.

O perfil dos espectros de IV das frações foi similar (Figura 23, 30, 39 e 40) entre si corroborando com o espectro do exopolissacarídeo sulfatado obtido por filtração do meio de cultivo alcalino de *Spirulina platensis* (MAJDOUB *et al.*, 2009).

As bandas identificadas na faixa de 3200-3500  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas à vibração de alongamento OH; 2920-2930  $\text{cm}^{-1}$  referente a vibrações de alongamento assimétrico CH e; 1000-1013  $\text{cm}^{-1}$  atribuído a vibrações de C-O-C do ciclo osídico do polissacarídeo (MAJDOUB *et al.*, 2009; MAO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011b; CAMARA *et al.*, 2011) foram observadas nos espectros de todas as frações analisadas neste estudo.

Segundo Synytsya e Novak (2014) a banda na região de 760  $\text{cm}^{-1}$  pode corresponder a ligações de ramificação  $\alpha$ -D glucana (1 $\rightarrow$ 4)(1 $\rightarrow$ 6) e na região de 580  $\text{cm}^{-1}$  a ligações  $\alpha$ -D- glucana (1 $\rightarrow$ 3), porém esta última banda (580  $\text{cm}^{-1}$ ) só foi observada nas frações submetidas a  $\beta$ -eliminação e na fração DPB 3,0M. Neste mesmo estudo, as bandas identificadas em 2859  $\text{cm}^{-1}$  na fração DPB 2,0M e 2849  $\text{cm}^{-1}$  na fração DPB 3,0M podem ser atribuídas a vibrações de alongamento simétrico de C-H e; as bandas em 929  $\text{cm}^{-1}$  identificadas nas frações  $\beta$ -eliminadas correspondem à vibração de alongamento CC, CO e de flexão COH da cadeia polissacarídica.

A presença do grupo sulfato nos polissacarídeos obtidos foi atribuída às bandas na faixa de 1220-1254  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes ao alongamento assimétrico de S=O (MAJDOUB *et al.*, 2009; MAO *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009) e as bandas na região 832-869  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes a C-O-S em posição axial (MAO *et al.*, 2009). Além dessas, a banda em 810  $\text{cm}^{-1}$ , observada nas frações DPB 2,0M e 3,0M, foi atribuída a vibrações simétricas de C-O-S associado ao grupo C-O-SO<sub>3</sub> segundo Zhang *et al.* (2011b). A dessulfatação novamente confirmou a presença de sulfato na cadeia dos polissacarídeos, visto que, as bandas características desse grupamento apresentaram-se menos intensas e mais amplas.

As bandas na faixa de 1630-1650  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a vibrações assimétricas de COO<sup>-</sup> (MAO *et al.*, 2009; CAMARA *et al.*, 2011) e as bandas entre 1360-1375  $\text{cm}^{-1}$  ao estiramento de flexão de OH de ácidos urônicos (SYNYTSYA e NOVAK, 2014). Nota-se que a banda (1360-1375  $\text{cm}^{-1}$ ) referente a OH de ácidos urônicos se mostrou deslocada e mais definida na amostra DPBdespig (banda em

1335  $\text{cm}^{-1}$ ) e ausente na fração DPB 3,0M. Esses dados sugerem que na fração DPB pode haver pigmentos ligados ao polissacarídeo que torna a banda menos intensa e, a ausência da banda na fração DPB 3,0M pode ser devido a sulfatação do grupamento OH na cadeia do ácido urônico, visto que, em um trabalho anterior houve a identificação de um ácido urônico sulfatado (ácido aldobiurônico) no spirulam (LEE *et al.*, 2000).

A banda em 1417  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a vibrações de flexão de O-C=O de ácido urônicos foi observada no espectro da fração DPB 3,0M (MAJDOUB *et al.*, 2009). Segundo Synytsya e Novak (2014), essa banda pode sofrer deslocamento devido interações intramoleculares. Dessa forma, a banda em 1402  $\text{cm}^{-1}$  observada nos espectros das frações  $\beta$ -eliminadas pode corresponder a esse grupo, o qual foi deslocado devido a novas interações moleculares após processo de  $\beta$ -eliminação.

A espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  em estado sólido buscou proporcionar um meio rápido e não destrutivo para caracterizar a possível estrutura química, as organizações e as interações dos polissacarídeos obtidos.

As ressonâncias entre 172-175 ppm podem ser atribuídas ao C de  $\text{COO}^-$  ou C=O já que, Chen *et al.* (2005) caracterizando um complexo polieletrólítico formado por condroitim sulfato e quitosana atribuíram a ressonância em 176 ppm ao C de  $\text{COO}^-$  e, Ugoala, Ndukwe e Ayo (2016) atribuíram ressonâncias entre 171-177 ppm ao C de C=O ao caracterizar metabólitos secundários (como os polissacarídeos), isolados de diferentes espécies de microalga, dentre elas a *Spirulina sp.*

Robic *et al.* (2009) analisando ulvanas, extraídas com diferentes solventes orgânicos, quanto a sua estrutura e interações com a parede celular da alga, atribuiu às ressonâncias entre 80-90 ppm e 60-65 ppm ao C4 e C6, respectivamente, para celulose e hemicelulose da parede celular da alga verde. Dessa forma, as ressonâncias em 81 e 82 ppm podem ser do C4 e ente 59-60 ppm ao C6 dos polissacarídeos sulfatados obtidos, ricos em glicose.

Ao analisar extrato de polissacarídeos de caule de *Grewia mollis*, Nep.e Conway (2010) atribuiu as ressonâncias próximas a 18 ppm a grupos  $\text{CH}_3$  de ramnose, um dos monossacarídeos mais presente no polissacarídeo sulfatado extraído neste trabalho.

Zhang *et al.* (2011a) sintetizou e analisou o grau e padrão de sulfatação de celulose sulfatada. Neste trabalho, foi observado que a ressonância do C6 era representada por dois sinais entre 60-65 ppm, após sulfatação na posição da hidroxila 6-O esses sinais são representados por ombros deslocados para 70-65 ppm. A partir

disso, analisando os espectros das frações DPB e DPBdespig e seus análogos dessulfatados, podemos perceber que as frações dessulfatadas (DPB dessulf e DPBdespig dessulf) apresentam dois sinais, em 61 ppm e 52 ppm, enquanto as frações sulfatadas (DPB e DPBdespig) apresentam sinais formando ombros em 60-61 ppm e 58 ppm, sugerindo sulfatação do C6. Para a fração DPB 3,0M um sinal é observado em 59 ppm podendo ainda ser o C6 sulfatado.

Zhang *et al.* (2011a) atribui a ressonância em 102 ppm ao carbono anomérico do polissacarídeo (C1) da celulose que foi deslocado para 100 ppm por influência da sulfatação. Logo, as ressonâncias em 102 e 100 ppm das frações são devido ao C1.

Segundo Zhang *et al.* (2011a) e Ugoala, Ndukwe e Ayo (2016) as ressonâncias observadas entre 70 e 76 ppm nas frações podem ser atribuídas aos carbonos C2, C3, e C5 de polissacarídeo.

Apesar de já haver relatos sobre a atividade anticoagulante de polissacarídeos de *Spirulina sp* (YAMAMOTO *et al.*, 2003; YAMAMOTO *et al.*, 2005; BAKY *et al.*, 2013), não foi observado atividade anticoagulante para os polissacarídeos obtidos neste trabalho sob as condições testadas.

De maneira geral, durante a avaliação da atividade antioxidante dois fatores devem ser levados em consideração. O primeiro é a eficiência do sequestro do radical, que é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante, mas também pela sua concentração. O segundo fator está relacionado com o espectro de ação do antioxidante, por sua vez modulado pela solubilidade, assim faz-se necessário a realização de vários modelos de ensaios *in vitro* para predizer o potencial antioxidante real da amostra frente às diferentes condições (FERRONATTO *et al.*, 2006).

O método antioxidante pelo sequestro do radical DPPH baseia-se na captura deste radical por substâncias antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 517 nm. Trata-se de um teste simples e amplamente empregado como um teste de predição de uma potencial atividade antioxidante de produtos naturais (RUFINO *et al.*, 2007; YAMASAKI *et al.*, 1994). Neste trabalho, os polissacarídeos sulfatados das frações DPB e DPBdespig apresentaram atividade antioxidante (53,15% e 42,96%, respectivamente) menor do que relatado por Kurd e Samavati (2015), que obtiveram uma atividade de 78% para polissacarídeos sulfatados obtidos por lise celular e precipitação com etanol 80%. No entanto, os resultados encontrados foram maiores do que os relatados por Chaiklahan *et al.* (2013) (31,0%), que analisou a atividade antioxidante de um extrato de polissacarídeos sulfatados, obtidos por

extração aquosa a quente. Os polissacarídeos obtidos por estes autores continham um alto conteúdo de fenólicos (45,0%), segundo os autores, esses metabólitos secundários podem estar ligados ao carboidrato, contribuindo para a atividade antioxidante. A presença desses compostos não foi detectada em nenhuma das frações analisadas.

O método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, portanto, determina a atividade de uma amostra de proteger um substrato lipídico da oxidação, correlacionando com a peroxidação lipídica que ocorre no organismo. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). As frações DPB e DPBdespig apresentaram melhor atividade antioxidante neste sistema (Figura 46 e 47). Os valores de F1 e F2 (Tabela 21) relacionam o mecanismo de ação da atividade antioxidante dos polissacarídeos no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico a sua capacidade em doar elétrons ou átomos de hidrogênio, prolongando o período de indução na oxidação do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA, *et al.*, 2006; JARDINI, MANCINI FILHO, 2007). Esse dado correlaciona os resultados de ambos os testes antioxidantes realizados.

Após modificações químicas,  $\beta$ -eliminação e dessulfatação, ambas as atividades antioxidantes analisadas se apresentaram menores, com exceção da fração DPBdespig dessulf (250  $\mu\text{g/mL}$ ) no teste de seqüestro do radical DPPH. Sugere-se que esses resultados sejam devido às mudanças intramoleculares na cadeia do polissacarídeo causadas pelas modificações químicas.

## 6. CONCLUSÕES.

Os resultados encontrados neste trabalho nos permitiram concluir que:

- As diferentes condições utilizadas para a extração de polissacarídeos da biomassa comercial de *Spirulina sp* levaram a obtenção de rendimentos de açúcar total que variaram de 2,27% a 20,23% e, a perfis de migração eletroforética em gel de agarose 0,5% tampão PDA distintos, bem como, a distintas intensidades de metacromasia;
- Por apresentar atividade metacromática mais intensa, a fração de polissacarídeos sulfatados DPB, obtido pela extração que envolve lise celular e proteólise com papaína, foi empregado nas etapas de purificação, modificações e caracterização química e análise de atividades biológicas;
- As análises físico-químicas e espectroscópicas demonstraram que a fração de polissacarídeos sulfatados DPB possui peso molecular estimado próximo a 130 e 40 kDa sendo constituído por majoritariamente por glicose, além de, ramnose, galactose e ácidos urônicos (ácido glicurônico e, possivelmente, ácido aldobiturônico);
- A fração DPB submetido à cromatografia de troca iônica em *Q-Sepharose* permitiu a obtenção das frações DPB 2,0M e DPB 3,0M que apresentam densidade de carga distinta e composição monossacarídica semelhante a fração DPB;
- As frações DPB e DPBdespig submetidas a  $\beta$ -eliminação quando analisadas por dosagens químicas apresentaram maior teor de açúcar total, sulfato e ácido urônico corroborados pelas análises espectroscópicas (Raman, IV e RMN). Além disso, elas apresentaram peso molecular estimado em gel de agarose 1% em tampão TBE único, próximo a 100 KDa.

- A presença de grupamento sulfato nos polissacarídeos, DPB e DPBdespig, foi confirmada pelas análises espectroscópicas após processo de dessulfatação das frações, as quais apresentaram diminuição nas bandas e sinais referente a grupo sulfato, sugerindo que este processo leva a modificação estrutural dos polissacarídeos sulfatados;
- Nenhuma das frações analisadas apresentaram atividade anticoagulante *in vitro* nas condições testadas;
- As frações DPB e DPBdespig apresentaram atividade antioxidante, em torno de 45% pelo método de seqüestro do radical DPPH (250 µg/mL) e em torno de 55% pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (38,6 µg/mL);
- Os resultados dos fatores cinéticos (F1 e F2) das frações DPB e DPBdespig corroboraram com os resultados obtidos no teste antioxidantes de DPPH, sugerindo que as frações atuem em mecanismos primários de oxidação, ou seja, bloqueando ou interagindo com radicais livres formados;
- A atividade antioxidante foi menor para as frações DPB e DPBdespig submetidas a modificações químicas ( $\beta$ -eliminação e dessulfatação), sugerindo a importância da relação estrutura e atividade biológica.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, A. B. et al. Pharmaceutical, cosmeceutical, and traditional applications of marine carbohydrates. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 73, p. 197-220, 2014.
- BAKY H, A.E.; BAZ KF, H.E.; LATIFE AS, E. Induction of Sulfated Polysaccharides in *Spirulina platensis* as Response to Nitrogen Concentration and its Biological Evaluation. **J Aquac Res Development**, v. 5, n. 206, p. 2, 2013.
- BERTOZZI, C. R.; RABUKA, D. Structural basis of glycan diversity. In: Varki, A.; Cummings, R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G. W.; Etzler, M.E. **Essencial Glycobiology**. 2ª Edição. Nova York, 2009, capítulo 6, Book Pubmed.
- BHILOCHA, S.; AMIN, R.; PANDYA, M.; YUAN, H.; TANK, M.; LOBELLO, J.; COWMAN, M. K. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis methods for molecular mass analysis of 5-to 500-kDa hyaluronan. **Analytical biochemistry**, v. 417, n.1, p. 41-49, 2011.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-2000, 1958.
- BORSIG, L. *et al.*. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 14984-14991, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BURG, A.; OSHRAT, L.O. Salt Effect on the Antioxidant Activity of Red Microalgal Sulfated Polysaccharides in Soy-Bean Formula. **Marine drugs**, v. 13, n. 10, p. 6425-6439, 2015.
- CAMARA, R. B. G. *et al.*. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Marine Drugs**, v. 9, n. 1, p. 124-138, 2011.
- CARVAJAL, J. C. L. **Caracterização e modificações químicas da proteína da microalga *Spirulina (Spirulina maxima)***. 2009. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologias de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2009.
- CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; TRIRTANA, P.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. **International journal of biological macromolecules**, v. 58, p. 73-78, 2013.
- CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; TRIRATANA, P.; TIA, S.; BUNNAG, B. Effect of extraction temperature on the diffusion coefficient of polysaccharides from *Spirulina* and the optimal separation method. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 19, n. 2, p. 369-377, 2014.

CHEN, W. *et al.*. Characterization of polyelectrolyte complexes between chondroitin sulfate and chitosan in the solid state. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 75, n. 1, p. 128-137, 2005.

CHEN, X. P. *et al.*. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 944-948, 2010.

CHOI, H. U.; MEYER, K. A. R. L. The structure of keratan sulphates from various sources. **Biochemical Journal**, v. 151, n. 3, p. 543-553, 1975.

COLMAN, R. W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin?. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 493-495, 2006.

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

COSTA, M.S.S.P. *et al.*. Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 5, p. 1159-1167, 2012.

CUNHA, A. L.; DE OLIVEIRA, L. G.; MAIA, L. F.; DE OLIVEIRA, L. F. C.; MICHELACCI, Y. M.; DE AGUIAR, J. A. K. Pharmaceutical grade chondroitin sulfate: Structural analysis and identification of contaminants in different commercial preparations. **Carbohydrate polymers**, v 134, p. 300-308, 2015.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science** **145**: 1310-1312, 1964.

DE CATERINA, R. *et al.*. Parenteral anticoagulants in heart disease: Current status and perspectives (Section II). **Thrombosis and haemostasis**, v. 109, n. 5, p. 769-786, 2013.

DE MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; DE MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed research international**, 2015.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DI FERRANTE, N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 220, n. 1, p. 303-6, May 1956.

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

DORE, C. M. P. Guerra et al.. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 467-475, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, pp. 446-452, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colourimetric Method For Determination of Sugars and Related Substances. **Anal Chem**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA,, M.; CERESO, A.S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. **Carbohydrate Research**, v. 325, n. 4, p. 287-299, 2000.

FÉLÉTOU, M. The Endothelium, Part I: Multiple Functions of the Endothelial Cells - Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. In: **Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function**. Morgan & Claypool Life Sciences, 2011. p. 1-306. Book pubmed.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN,E.D.; BEDNARSKI,F.; ALENCAR, S.M; ONOFRE, S.B. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v. 10, n. 2, p. 67-70, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILALI MOUHIM, R. *et al.*. Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnology letters**, v. 15, n. 6, p. 567-572, 1993.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 12, p. 239-243, 1912.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 229-237, 2001.

FUNAMI,T.; HIROE, M.; NODA, S.; ASAI, I.; IKEDA, S.; NISHINARI, K. Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cátions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n.4, p. 617-629, 2007.

GRAWISH, M. E. Effects of *Spirulina platensis* extract on Syrian hamster cheek pouch mucosa painted with 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene. **Oral oncology**, v. 44, n. 10, p. 956-962, 2008.

HAYASHI, T.; HAYASHI, K. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 1, p. 83-87, 1996.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 423-434, 2002.

HOSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231-1237, 2013.

JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Rev Bras Ciênc Farm**, v. 43, n.1, 2007.

JEHLIČKA, J.; EDWARDS, H. G. M.; OREN, A. Raman spectroscopy of microbial pigments. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 11, p. 3286-3295, 2014.

KANTOR, T. G.; SHUBERT, M. A method for desulfation of chondroitin sulfate. **Journal American Chemical Society**, v. 79, p. 152-153, 1957.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KURD, F.; SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 74, p. 498-506, 2015.

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

LEE, J.B.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; SANKAWA, U.; MAEDA, M.; NEMOTO, T.; NAKANISHI, H. Further purification and structural analysis of calcium spirulan from *Spirulina platensis*. **Journal of natural products**, v. 61, n. 9, p. 1101-1104, 1998.

LEE, J.B.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; SANKAWA, U. Structural analysis of calcium spirulan (Ca-SP)-derived oligosaccharides using electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of natural products**, v. 63, n. 1, p. 136-138, 2000.

LEE, J. B.; SRISOMPORN, P.; HAYASHI, K.; TANAKA, T.; SANKAWA, U.; HAYASHI, T. Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 49, n. 1, p. 108-110, 2001.

LI, X. L.; ZHOU, A. G. Evaluation of the antioxidant effects of polysaccharides extracted from *Lycium barbarum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 15, n. 9, p. 471-482, 2007.

LU, Y.; WANG, D.; HU, Y.; HUANG, X.; WANG, J. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 180-186, 2008.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature** 202: 498-499, 1964.

MAIA, L. F. *et al.* Monitoring of sulfated polysaccharide content in marine sponges by Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 87, p. 149-156, 2016.

MAJDOUB, H. *et al.* Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1377-1381, 2009.

MAO, W. *et al.* Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 1, p. 70-74, 2009.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, n.9, p. 594-598, 1968.

MATSUHIRO, B. Vibrational spectroscopy of seaweed galactans. **Hydrobiologia**, v. 326, n. 1, p. 481-489, 1996.

MELO, M. R. S. *et al.* Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 4, p. 491-498, 2002.

MERTENS, G.; CASSIMAN, J.J.; BERGHE, H.V.; VERMILENS, J.; DAVID, G. Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 28, p. 20435-20443, 1992.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 48, n. 2, p. 91-91, 1971.

MURTHY, K. N. C., RAJESHA, J.; SWAMY, M. M.; RAVISHANKAR, G. A. Comparative evaluation of hepatoprotective activity of carotenoids of microalgae. **Journal of medicinal food**, v. 8, n. 4, p. 523-528, 2005.

MUTHANA, S.M.; CAMPBELL, C.; GILDERSLEEVE, J C. Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 1, p. 31-43, 2012.

NADER, H. B. *et al.*. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 699-709, 2001.

NEP, E I.e CONWAY, B. R. Characterization of grewia gum, a potential pharmaceutical excipient. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 1, n. 1, p. 30-40, 2010.

NGO, D.; KIM, S. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. **International journal of biological macromolecules**, v. 62, p. 70-75, 2013.

OH, S.H.; AHN, J.; KANG, D.H.; LEE, H.Y. The effect of ultrasonicated extracts of *Spirulina maxima* on the anticancer activity. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 205-214, 2011.

PANIAGUA-MICHEL, J.J.; OLMOS-SOTO, J.; MORALES-GUERRERO, E. R. Algal and microbial exopolysaccharides: new insights as biosurfactants and bioemulsifiers. **Marine Carbohydrates: Fundamentals and Applications**, v. 73, p. 221, 2014.

PARAGES, M. L.; RICO, R.M.; ABDALA-DÍAZ, R.T.; CHABRILLÓN, M.; SOTIROUDIS, T.G.; JIMÉNEZ, C. Acidic polysaccharides of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* induce the synthesis of TNF- $\alpha$  in RAW macrophages. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 6, p. 1537-1546, 2012.

PIELESZ, A.; BINIAŚ, W.; PALUCH, J. Mild acid hydrolysis of fucoidan: characterization by electrophoresis and FT-Raman spectroscopy. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 13, p. 1937-1944, 2011.

PIGNOLET, O.; JUBEAU, S.; VACA-GARCIA, C.; MICHAUD, P. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 781-796, 2013.

PIZZOFERRATO, L. *et al.*. Solid-state  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectroscopy of mushrooms gives directly the ratio between proteins and polysaccharides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5484-5488, 2000.

PUGH, N.; ROSS, S. A.; ELSOHLY, H. N.; ELSOHLY, M. A.; PASCO, D. S. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. **Planta medica**, v. 67, n. 8, p. 737-742, 2001.

RAPOSO, M. F.J.; DE MORAIS, R. M. S. C.; DE MORAIS, A. M. M. B. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. **Marine drugs**, v. 11, n. 1, p. 233-252, 2013.

RECHTER, S.; KONIG, T.; AUEROCHS, S.; THULKE, S.; WALTER, H.; DORNENBURG, H.; WALTER, C.; MARSCHALL, M. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. **Antiviral research**, v. 72, n. 3, p. 197-206, 2006.

ROBIC, A. *et al.* Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyceae). **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 206-216, 2009.

ROCHA, H. A. O *et al.* Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum schroederi* AN IDEAL ANTITHROMBOTIC AGENT?. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41278-41288, 2005.

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; COVAS, D. T.; FONTES, A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

ROMAY, C. H.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36-41, 1998.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico online**, Fortaleza, 2007.

RYGULA, A. *et al.* Raman spectroscopy of proteins: a review. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 44, n. 8, p. 1061-1076, 2013.

SENNI, K.; PEREIRA, J.; GUENICHE, F.; DELBARRE-LADRAT, C.; SINQUIN, C.; RATISKOL, J.; GODEAU, G.; FISCHER, A.; HELLEY, D.; COLLIEC-JOUAULT, S. Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. **Marine drugs**, v. 9, n. 9, p. 1664-1681, 2011.

SHEN, S.; CHEN, D.; LI, X.; LI, T.; YUAN, M.; ZHOU, Y.; DING, C. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla*. **Carbohydrate polymers**, v. 104, p. 80-86, 2014.

SILVA, M. E.; DIETRICH, C. P. Structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 17, p. 6841-6846, 1975

SILVA, F. R. F. *et al.* Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26-33, 2010.

SILVA, T. M. A. *et al.* Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 4, p. 523-533, 2005.

SOSA, Venus *et al.* Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

SOTIROUDIS, T.G.; SOTIROUDIS, G.T. Health aspects of Spirulina (Arthrospira) microalga food supplement. **Journal of Serbain Chemical Society**, v.78, n.3, p. 395–405. 2013

SUN, L. et al.. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from two marine Chrysophyta. **Food chemistry**, v. 160, p. 1-7, 2014.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 2, 2014.

TIAN, H. *et al.*. Isolation, structure, and surfactant properties of polysaccharides from *Ulva lactuca* L. from South China Sea. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 577-582, 2015.

TOIDA, T.; CHAIDEDGUMJORN, A.; LINHARDT, R. J. Structure and bioactivity of sulfated polysaccharides. **Trends in glycoscience and glycotechnology**, v. 15, n. 81, p. 29-46, 2003.

TRABELSI, L. *et al.*. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 1, p. 27-31, 2009.

TREVELYAN, W. EI; PROCTER, D. P.; HARRISON, J\_ S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, n. 4219, p. 444-445, 1950.

UGOALA, E.; NDUKWE, G.; AYO, R. Isolation and Characterisation of Some Microalgae Bioactive Molecules. **ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS**, v. 4, n. 3, p. 323-347, 2016.

USP – The Pharmacopeia of the United States of America. 17<sup>a</sup> Revisão. Easton: Mack Printing Company, p. 609 – 611, 1965.

VALKO, M. *et al.*. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VARKI, A.; LOWE, J.B. Biological role glycans. In: Varki, A.; Cummings, R.D.; Esko, J.D.; Freeze, H.H.; Stanley, P.; Bertozzi, C.R.; Hart, G. W.; Etzler, M.E. **Essencial Glycobiology**. 2<sup>a</sup> Edição. Nova York, 2009, capítulo 6, Book Pubmed.

VASKO, P. D.; BLACKWELL, J.; KOENIG, J. L. Infrared and raman spectroscopy of carbohydrates: Part I: Identification of O–H and C–H-related vibrational modes for D-glucose, maltose, cellobiose, and dextran by deuterium-substitution methods. **Carbohydrate Research**, v. 19, n. 3, p. 297-310, 1971.

WANG, W.; WANG, S.; GUAN, H. The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview. **Marine drugs**, v. 10, n. 12, p. 2795-2816, 2012.

WANG, L. *et al.*. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. **Marine drugs**, v. 12, n. 9, p. 4984-5020, 2014.

WHINNA, H. C.; CHOI, H.U.; ROSENBERG, L.C.; CHURCH, F.C. Interaction of heparin cofactor II with biglycan and decorin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 6, p. 3920-3924, 1993.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration physiology**, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R. e KIM, S.K. **Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae** Carbohydrate Polymers, 84 (2011), pp. 14–21

YAMASAKI, K.; HASHIMOTO, A.; KOKUSENYA, Y.; MIYAMOTO, T.; SATO, T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p. 1663-1165, 1994.

YAMAMOTO, C.; NAKAMURA, A.; SHIMADA, S.; KAJI, T.; LEE, J. B.; HAYASHI, T. Differential effects of sodium spirulan on the secretion of fibrinolytic proteins from vascular endothelial cells: Enhancement of plasminogen activator activity. **Journal of health science**, v. 49, n. 5, p. 405-409, 2003.

YAMAMOTO, C. *et al.*. Proteoglycans released from cultured bovine aortic endothelial cell layers by sodium spirulan are both perlecan and biglycan. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 32-36, 2005.

YAMAMOTO, C.; FUJIWARA, Y.; KAJI, T. The biological effects of depolymerized sodium spirulan and sulfated colominic acid on vascular cells are beneficial in preventing atherosclerosis. **Journal of health science**, v. 52, n. 3, p. 205-210, 2006.

YANG, L. *et al.* Inhibitory effects of polysaccharide extract from *Spirulina platensis* on corneal neovascularization. **Molecular Vision**, v. 15, p. 1951-1961, 2009

YOSHINARI, O.; SHIOJIMA, Y.; IGARASHI, K. Hepatoprotective effect of germanium-containing *Spirulina* in rats with D-galactosamine- and lipopolysaccharide-induced hepatitis. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 01, p. 135-140, 2014.

ZAVYALOVA, E.; KOPYLOV, A. Exploring potential anticoagulant drug formulations using thrombin generation test. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 5, p. 111-119, 2016.

ZHANG, Z. *et al.*. Preparation of the different derivatives of the low-molecular-weight porphyrin from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant activities in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 45, n. 1, p. 22-26, 2009.

ZHANG, K. *et al.*. Synthesis and spectroscopic analysis of cellulose sulfates with regulable total degrees of substitution and sulfation patterns via  $^{13}\text{C}$  NMR and FT Raman spectroscopy. **Polymer**, v. 52, n. 1, p. 26-32, 2011a.

ZHANG, H. *et al.*. In vitro antioxidant activities of sulfated derivatives of polysaccharides extracted from *Auricularia auricular*. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3288-3302, 2011b.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v.50, p. 47-53, 2004.

ZHONG-WU, G.; YONG-ZHENG, H. Isolation and structural elucidation of a polysaccharide with radiation-protective activity from *Spirulina platensis*. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 279-285, 1996.