

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,
ATIVIDADES INFLAMATÓRIA E IMUNOADJUVANTE DE
ALGINATOS DA ALGA MARINHA *Sargassum vulgare* C.
Agardh**

MÁRCIA ROCHA TORRES

FORTALEZA - CEARÁ
2003

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,
ATIVIDADES INFLAMATÓRIA E IMUNOADJUVANTE DE
ALGINATOS DA ALGA MARINHA *Sargassum vulgare* C.
Agardh**

MÁRCIA ROCHA TORRES

Orientadora: Dr^a Maria da Guia Silva Lima

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CENTRO DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese será permitida, desde que seja feita de acordo com as normas de ética científica.

Márcia Rocha Torres

TESE APROVADA EM: 5 de Novembro de 2003

Dra Maria da Guia Silva Lima
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador da Tese

Dra Regina Célia Monteiro de Paula
Deptº Química Inorgânica
Universidade Federal do Ceará
Co-orientador da Tese

Dra Deijanira Alves de Albuquerque
Deptº de Ciências Básicas em Saúde
Universidade Federal do Mato Grosso
Conselheiro

Dra Diana Célia Sousa Nunes
Pinheiro
Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade Estadual do Ceará
Conselheiro

Dra Dirce Fernandes de Melo
Deptº de Bioq. e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Eu dedico esta Tese a todos que me ajudaram direta e indiretamente na
realização deste trabalho e em especial à minha filha

Luiza Torres.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Maria da Guia Silva Lima, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e por suas colaborações.

À professora Dr^a Regina Célia Monteiro de Paula do Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pela sua ajuda não somente nos experimentos, mas principalmente nas correções deste trabalho.

À professora Dr^a Deijanira Alves de Albuquerque do Departamento de Ciências Básicas em Saúde Universidade Federal do Mato Grosso, pelos seus conhecimentos transmitidos, além do apoio concedido.

À professora Dr^a Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, pelo apoio e incentivo.

À professora Dr^a Dirce Fernandes de Melo, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio.

À amiga Ana Cláudia Marinho, do laboratório de imunologia (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular) da Universidade Federal do Ceará, pela ajuda nos experimentos e apoio.

Às amigas, Maria Izabel Florindo Guedes, Maria de Lourdes Otoch, Izabella Brasil e Maria Erivalda Farias, pelos constantes incentivos, pela amizade e principalmente pelos momentos de descontração.

Ao meu esposo, Eduardo, pela ajuda na formatação deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pela ajuda e amizade.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Carboidratos.....	1
1.1.1. Polímeros.....	2
1.1.2. Gomas.....	4
1.1.2.1. Polissacarídeos de algas.....	8
1.2. Alginatos.....	9
1.2.1. Histórico.....	9
1.2.2. Ocorrência e Localização.....	9
1.2.3. Composição.....	12
1.2.4. Seqüência.....	12
1.2.5. Usos e aplicações.....	12
1.2.6. Alginato como carreador de agentes biológicos.....	13
1.3. O sistema imune.....	16
1.3.1. Resposta imune.....	17
1.4. Via de imunização.....	18
1.5. Imunoadjuvantes.....	18
1.6. Inflamação.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos.....	27
2.2.1. Isolamento e caracterização físico-química de dois alginatos presentes na alga marinha <i>Sargassum vulgare</i>	27
2.2.2. Utilização dos alginatos associados ou não a ovalbumina, para o estudo da resposta imunológica humoral de camundongos imunizados pela via subcutânea, oral e nasal.....	27

2.2.3.	Avaliar o efeito dos alginatos em três modelos de inflamação: migração celular por bolsa de ar subcutânea, migração celular por cavidade peritoneal e permeabilidade vascular.	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1.	MATERIAL VEGETAL	28
3.1.1.	Coleta e Acondicionamento das Algas Marinhas.....	28
3.2.	ANIMAIS	28
3.3.	MÉTODOS	28
3.3.1.	Identificação das Espécies	28
3.3.2.	Extração de alginatos da macroalga <i>Sargassum vulgare</i>	28
3.3.3.	Determinação de Proteína.....	29
3.3.4.	Determinação de Umidade	29
3.3.5.	Determinação de Cinzas.....	31
3.3.6.	Determinação de Microelementos	31
3.3.7.	Determinação da Viscosidade Intrínseca.....	31
3.3.8.	Geleificação	32
3.3.9.	Determinação da Fluorescência	32
3.3.10.	Determinação da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel.	32
3.3.11.	Determinações Reológicas	33
3.3.12.	Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	33
3.3.13.	Hidrólise ácida Parcial.....	33
3.3.14.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	33
3.3.15.	Uso de Alginatos como Imunoadjuvantes	34
3.3.15.1.	Preparação da mistura de alginatos com e sem ovalbumina para utilização em via subcutânea	34
3.3.15.2.	Preparação da mistura de alginatos com e sem ovalbumina para utilização em via oral.....	34
3.3.15.3.	Preparação da mistura de alginatos em gel com e sem ovalbumina para utilização em via oral.....	34
3.3.15.4.	Preparação da mistura de alginatos com e sem ovalbumina para utilização em via nasal	35
3.3.15.5.	Imunização por via subcutânea com ovalbumina associada ou não aos alginatos purificados -V e +V.....	35
3.3.15.6.	Imunização por via oral com ovalbumina associada ou não aos alginatos purificados -V e +V.....	35
3.3.15.7.	Imunização por via nasal com ovalbumina associada ou não aos alginatos purificados -V e +V.....	36

3.3.15.8.	Imunização por via oral com ovalbumina associada ou não aos alginatos purificados -V e +V gelificados.....	37
3.3.16.	Obtenção dos antissoros.....	37
3.3.17.	Testes Sorológicos:.....	38
3.3.17.1.	Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	38
3.3.17.2.	Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)	38
3.3.17.2.1.	PCA para IgE.....	39
3.3.18.	Atividade Tóxica (DL-50).....	39
3.3.19.	Efeito dos alginatos -V e +V de <i>S. vulgare</i> sobre a migração celular para a bolsa de ar subcutânea em camundongos	40
3.3.20.	Efeito dos alginatos purificados -V e +V de <i>S. vulgare</i> sobre a migração de neutrófilos e macrófagos para a cavidade peritoneal em camundongos.....	40
3.3.21.	Efeito dos alginatos purificados -V e +V de <i>S. vulgare</i> sobre o influxo de proteína na cavidade peritoneal em camundongos.....	41
3.3.22.	Efeito dos alginatos purificados -V e +V de <i>S. vulgare</i> sobre a permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos.....	41
3.3.23.	Análise estatística	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1.	Extrações dos alginatos	43
4.2.	Viscosidade específica das frações dos alginatos	44
4.3.	Determinação do Teor de Umidade e de Cinzas.....	45
4.4.	Determinação do Teor de Proteínas	46
4.5.	Análise elementar.....	46
4.6.	Determinação da Fluorescência.....	47
4.7.	Determinação da Viscosidade Intrínseca dos Alginatos.....	48
4.8.	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	54
4.9.	Determinação da proporção de resíduos M/G por Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H.....	56
4.10.	Determinação da Massa Molecular por Cromatografia de Permeação em Gel.....	59
4.11.	Geleificação.....	60
4.12.	Resposta imunológica humoral de camundongos “swiss” imunizados com a ovalbumina por via subcutânea, associada ou não com os alginatos purificados de <i>Sargassum vulgare</i> -V e +V e Al(OH) ₃	61
4.13.	Resposta imunológica humoral de camundongos “swiss” imunizados com ovalbumina por via oral associada ou não aos alginatos purificados -V e +V de <i>Sargassum vulgare</i> e com os alginatos purificados -V e +V de <i>Sargassum vulgare</i> sem a ovalbumina	63

4.14.	Resposta imunológica humoral de camundongos "swiss" imunizados com ovalbumina por via nasal, associada ou não aos alginatos purificados -V e +V.....	65
4.15.	Resposta imunológica humoral de camundongos "swiss" imunizados com ovalbumina por via oral associada ou não aos alginatos purificados -V e +V gelificados e com os alginatos purificados -V e +V gelificados sem a ovalbumina..	66
4.16.	Avaliação da Resposta IgE específica por PCA.....	67
4.17.	Atividade Tóxica	68
4.18.	Avaliação do efeito dos alginatos -V e +V em bolsa de ar subcutânea sobre a migração de neutrófilos e macrófagos.	71
4.19.	Avaliação do efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos e macrófagos.	73
4.20.	Avaliação do efeito dos alginatos -V e +V sobre a permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos.	76
5.	CONCLUSÃO.....	77
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Classificação de polissacarídeos relativa à ramificação e composição. Cada letra representa um monossacarídeo (Lehninger et. al., 2000).....	2
Figura 2 –	Arranjos de acordo com a disposição dos monômeros (Stevens, 1990)...	3
Figura 3 –	Representação dos tipos de polímeros: a) linear, b) ramificado e c) em rede (Stevens, 1990).	4
Figura 4 –	Exemplar vivo de <i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh.	11
Figura 5 –	Monômeros de alginato, a) conformação Haworth de M: β – D – manuronato; G: α – L – guluronato, b) cadeias de alginato na conformação cadeira, c) representação simbólica de uma cadeia de alginato, M: β – D – manuronato; G: α – L – guluronato (Moe et. al., 1995).....	13
Figura 6 –	Representação das etapas da migração celular (Salvemini et. al., 2002).	25
Figura 7 –	Fluxograma do esquema de extração dos alginatos.	30
Figura 8 –	Rendimento das frações de alginatos de <i>Sargassum vulgare</i> nas diferentes temperaturas e tempos de extração.....	43
Figura 9 –	Viscosidade específica das frações de alginato de <i>S. vulgare</i> nas diferentes temperaturas e tempos de extração.....	45
Figura 10 –	Espectro de fluorescência dos alginatos de <i>Sargassum vulgare</i> . A) alginato bruto +V, B) alginato bruto –V, C) alginato purificado +V, D) alginato purificado –V e E) solvente (água).	47
Figura 11 –	Viscosidade intrínseca do alginato mais viscoso (+V), em NaCl 0,1M e temperatura de 25°C.	48
Figura 12 –	Viscosidade intrínseca do alginato menos viscoso (-V), em NaCl 0,1M e temperatura de 25°C.	49
Figura 13 –	Comportamento reológico do alginato +V em diferentes concentrações, em NaCl 0,1M.....	53
Figura 14 –	Comportamento reológico do alginato –V em diferentes concentrações, em NaCl 0,1M.....	53
Figura 15 –	Espectro na região de infravermelho do alginato –V de <i>Sargassum vulgare</i> em pastilhas de KBr.....	54
Figura 16 –	Espectro na região de infravermelho do alginato +V de <i>Sargassum vulgare</i> em pastilhas de KBr.....	55
Figura 17 –	Espectro de ^1H RMN em D_2O para o alginato +V hidrolisado.....	57
Figura 18 –	Espectro de ^1H RMN em D_2O para o alginato –V hidrolisado.....	57
Figura 19 –	Cromatografia de GPC dos alginatos purificados de <i>Sargassum vulgare</i> . Em A) alginato +V e em B) alginato –V.	59
Figura 20 –	Geleificação do alginato – V de <i>Sargassum vulgare</i> em diferentes concentrações da amostra versus temperatura.....	60

- Figura 21 - Geleificação do alginato +V de *Sargassum vulgare* em diferentes concentrações da amostra *versus* temperatura..... 61
- Figura 22 - Cinética da síntese de IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de ovalbumina associada aos alginatos -V e +V de *Sargassum vulgare* e ao Al(OH)₃. As setas representam os reforços administrados. 62
- Figura 23 - Cinética da síntese de IgG em camundongos imunizados por via oral com 100 µg de ovalbumina associada ou não aos alginatos -V e +V de *Sargassum vulgare* e aos alginatos -V e +V sem ovalbumina..... 64
- Figura 24 - Cinética da síntese de IgG em camundongos imunizados por via nasal com 10 µg de ovalbumina associada ou não aos alginatos -V e +V de *Sargassum vulgare*..... 65
- Figura 25 - Cinética da síntese de IgG em camundongos imunizados por via oral com 100 µg de ovalbumina associada ou não aos alginatos -V e +V de *Sargassum vulgare* gelificados e aos alginatos -V e +V gelificados sem ovalbumina. 67
- Figura 26 - A) Resposta imunológica do tipo IgE, detectado por PCA em soros de camundongos imunizados por via subcutânea. B) Representação gráfica da resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de ovalbumina, 100 µg de ovalbumina + alginato -V e com 100 µg de ovalbumina + alginato +V. 69
- Figura 27 - A) Resposta imunológica do tipo IgE, detectado por PCA em soros de camundongos imunizados por via nasal. B) Representação gráfica da resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via nasal com 100 µg de ovalbumina, 100 µg de ovalbumina + alginato -V e com 100 µg de ovalbumina + alginato +V. 70
- Figura 28 - Efeito dos alginatos -V e +V em bolsa de ar subcutânea sobre a migração de neutrófilos. Os valores estão expressos como média e ± erro padrão (n= 10). 71
- Figura 29 - Efeito dos alginatos -V e +V em bolsa de ar subcutânea sobre a migração de macrófagos. Os valores estão expressos como média e ± erro padrão (n= 10). 72
- Figura 30 - Efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos. Os valores estão expressos como média ± erro padrão (n=10). 74
- Figura 31 - Efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre a migração de macrófagos. Os valores estão expressos como média ± erro padrão (n=10) 74
- Figura 32 - Efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre o influxo de proteínas totais. Os valores estão expressos como média ± erro padrão (n=10) 75
- Figura 33 - Efeito dos alginatos -V e +V sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos. Os valores estão expressos como média ± erro padrão (n=10). 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação de algumas gomas comerciais.	6
Tabela 2 –	Gomas hidrossolúveis: funções e aplicações na indústria de alimentos..	7
Tabela 3 –	Classificação de <i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh.....	10
Tabela 4 –	Exemplos de células imobilizadas no alginato.....	16
Tabela 5 –	Vantagens e desvantagens de vacinas liberadas por via parenteral versus via oral e nasal.....	19
Tabela 6 –	Modos de ação de adjuvantes.....	22
Tabela 7 –	Rendimento dos alginatos de espécies de algas marinhas marrons.....	44
Tabela 8 –	Determinação de teores de umidade e cinzas por incineração dos dois alginatos de <i>Sargassum vulgare</i>	45
Tabela 9 –	Determinação do potencial de íons e proteína dos dois alginatos de <i>Sargassum vulgare</i>	46
Tabela 10 –	Comparação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ de alginatos provenientes de diferentes fontes de algas.....	49
Tabela 11 –	Valores de a de alguns alginatos algais.	50
Tabela 12 –	Valores de M_w e M_n de diferentes alginatos de algas.....	52
Tabela 13 –	Atribuição das principais bandas no espectro na região do infravermelho dos alginatos.....	55
Tabela 14 -	Valores de F_M , F_G e a razão de M/G de alginatos de diferentes fontes. . .	58

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

$(\text{CH}_2\text{O})_n$ - Hidratos de carbono

EB - Extrato bruto

BSA - Albumina sérica bovina

BSA - Bolsa de ar subcutânea

C - Carbono

H - Hidrogênio

N - Nitrogênio

Alginato -V - Alginato menos viscoso

Alginato+ V - Alginato mais viscoso

μm - Micrômetro

mg - Miligrama

μg - Micrograma

μL - Microlitro

M - Molar

M_{pk} - Massa molar no pico

RMN – Ressonância magnética nuclear

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

PBS - tampão fosfato

PBS-Tween-20 - Tampão fosfato contendo o detergente Tween-20

PBS- Molico - Tampão fosfato contendo o leite molico Nestlé

OPD - Substrato cromógeno o-Phenylenediamine Dihydrochloride

A492nm - Absorbância a 492 nm

Ip - via Intraperitoneal

$\text{Al}(\text{OH})_3$ - Hidróxido de alumínio

RESUMO

No presente trabalho, foi feita a caracterização de dois alginatos -V e +V da alga marinha *Sargassum vulgare*, individualizados com base na propriedade de viscosidade e da massa molar. No intuito de determinar a capacidade imunoadjuvante dos mesmos, para possível uso em protocolos de imunização, eles foram usados na imunização de camundongos "swiss", associados à ovalbumina, como antígeno. As imunizações foram feitas pelas vias oral, nasal e subcutânea. Pela via subcutânea os alginatos -V e +V, sob a forma solúvel, potenciaram a resposta imune de anticorpos específicos em nível comparável ao do $Al(OH)_3$. Não houve diferença nos títulos de imunoglobulina totais, sobretudo da resposta primária em presença dos dois alginatos, até o 21º dia após a imunização. Não houve aumento da resposta imune secundária anti-ovalbumina em presença dos dois alginatos -V e +V. Houve discreto aumento da síntese de IgE específica com o uso de -V e +V, sendo que em presença de +V a resposta foi, aparentemente, mais precoce que em presença de -V, que só se revelou em resposta secundária. Além disso, a resposta secundária em presença de +V diminuiu menos que a resposta em presença de -V após o 2º reforço. Os dois alginatos foram utilizados como imunoadjuvantes nas formas solúvel e de gel pela via oral. Com o uso dos adjuvantes na forma solúvel, ambos induziram respostas primárias semelhantes, até o 15º dia após a imunização. Com os adjuvantes na forma gelificada, contrariamente, não houve potencialização em resposta primária e a potencialização na presença tanto de -V como de +V só se revelou após o 2º reforço, no 30º dia após a imunização. Não houve síntese de IgE específica nas imunizações pela via oral, quer com ovalbumina associada a +V ou com -V, tanto na forma solúvel quanto na gelificada. Nas imunizações pela via nasal com o uso de qualquer dos alginatos não foi detectada síntese de anticorpos específicos. Os alginatos -V e +V exerceram efeito pró-inflamatório, recrutando neutrófilos e macrófagos, tanto pelo método de bolsa de ar subcutânea, quanto pelo método da cavidade peritoneal, embora em níveis reduzidos em relação aos controles. Os alginatos provocaram também extravasamento de proteínas, mas somente o alginato +V foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular. Apesar da necessidade de experimentos adicionais, diante das características encontradas para os dois alginatos, sugere-se que eles possam vir a ser utilizados como adjuvantes em protocolos de vacinação animal e/ou humana.

ABSTRACT

In the present work, it was made the characterization of two alginates -V and +V of the marine alga *Sargassum vulgare*, individualized on base in the viscosity and the mass molar. With the aim of determining their immunoadjuvant capacity, for a possible use in immunization protocols, these alginate were used to immunize "swiss" mice, associated to ovalbumin, as antigen. The immunizations were made through the oral, nasal and subcutaneous routes. For the subcutaneous route the alginates -V and +V, under the soluble form, potentiated the immune response of specific antibodies in level comparable to that of Al(OH)₃. There was no difference in the titles of specific antibodies, along all the primary response in the presence of the two alginates, up to the 21st. day after starting immunization. There was no increase of the secondary immune response against ovalbumin in the presence of the two alginates. -V and +V. There was a discret increase of the synthesis of specific IgE with the use of -V and +V and, in the presence of +V the response was, aparently earlier than in the presence of -V that was only revealed in secondary response. Furthermore, the secondary response, in the presence of +V, decreased less than the response in the presence of -V, after the 2nd booster. The two alginates were used as imunoadjuvants in the soluble and gel forms, for oral immunizations. With the use of both adjuvants, in the soluble form, they induced similar primary responses, up to the 15th day after starting immunization. With the adjuvantes under the gel form, contrarily, there was no potentiation of the primary response and the potentiation in the presence of -V as well as of +V it was only revealed after the 2nd booster, in the 30th day after the immunization. There was no synthesis of specific IgE in the oral immunizations with ovalbumin associated either to +V and -V in the soluble or gel forms. In the immunizations through nasal route, with the use of both alginates, synthesis of specific antibodies was not detected. The alginates -V and +V exerted pro-inflammatory effect, recruiting neutrophils and macrophages, by both subcutaneous air pouch or by peritoneal cavity, although in lower levels than the controls. Both alginates also provoked protein extravasation, but only the alginate +V was able to increase the vascular permeability. In spite of needing further experiments, based on the characteristics found for the two alginates, it is suggested that they can come to be used as adjuvants in protocols of vaccination.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carboidratos

Os carboidratos são polihidroxi aldeídos ou polihidroxi cetonas, ou substâncias que liberam esses compostos por hidrólise. Muitos compostos desta classe têm fórmulas empíricas $(CH_2O)_n$ sugerindo que eles são “hidratos de carbono”, ou seja, neles a relação de C:H:O é de 1:2:1 (Lehninger *et al.*, 2000).

De acordo com o seu tamanho, existem três classes principais de carboidratos: os monossacarídeos, os oligossacarídeos e os polissacarídeos (sacarídeo é derivado do grego *sakaron* e significa “açúcar”).

Os **monossacarídeos**, ou açúcares simples, consistem de uma única unidade de polihidroxi aldeído ou cetona. O mais abundante na natureza é a D-glicose, um açúcar com 6 átomos de carbono na molécula. Os **oligossacarídeos** são carboidratos que consistem de cadeias curtas de unidades de monossacarídeos unidas entre si por ligações glicosídicas características. Os mais abundantes e conhecidos são os dissacarídeos (cadeias formadas por duas unidades de monossacarídeos). O dissacarídeo mais típico é a sacarose (açúcar de cana), que consiste de dois açúcares, D-glicose e a D-frutose ligados covalentemente entre si. Os **polissacarídeos** são polímeros de carboidratos que consistem de longas cadeias, contendo centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos. De acordo com suas funções os polissacarídeos podem agir como material de reserva, dentre eles estão o amido, o glicogênio, fructanas e algumas galactomananas, também podem agir como componente estrutural, como exemplo temos a celulose de plantas superiores, a quitina de leveduras, a manana de plantas e a xilana de algas, e ainda podem ter função protetora (gomas de exudados de plantas agindo na selagem de partes injuriadas). De acordo com Lehninger *et al.*, (2000), os polissacarídeos também diferem entre si na identidade das suas unidades monossacarídicas e nos tipos de ligação que as une, no comprimento das suas cadeias e no grau de ramificação das mesmas. Os homopolissacarídeos contêm apenas um único tipo de unidade monomérica, enquanto que o heteropolissacarídeo contém dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas (Figura 1).

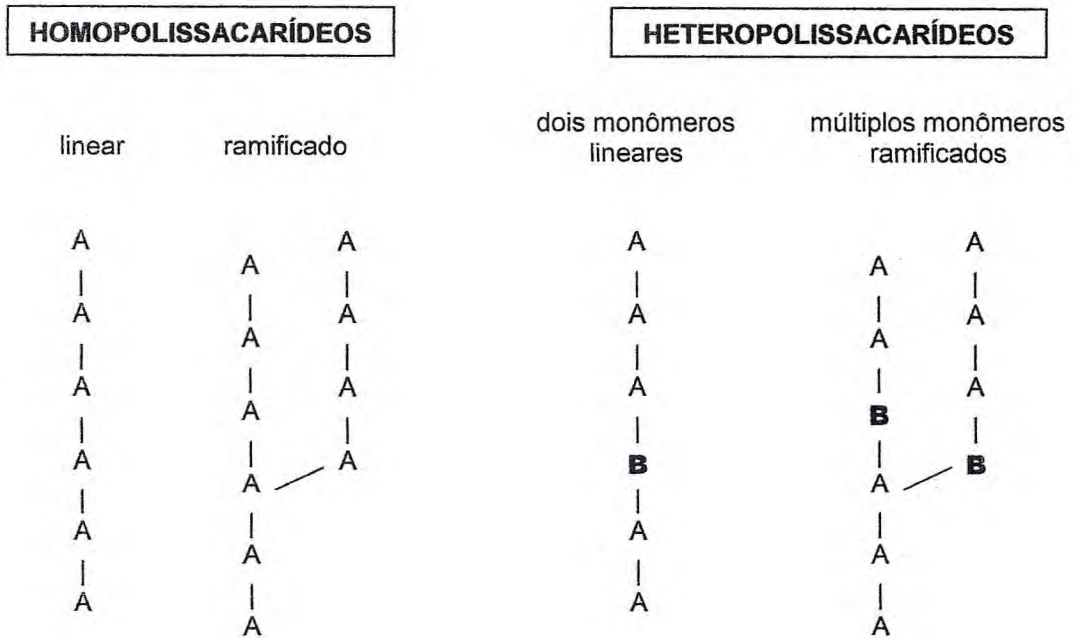


Figura 1 – Classificação de polissacarídeos relativa à ramificação e composição. Cada letra representa um monossacarídeo (Lehninger *et. al.*, 2000).

1.1.1. Polímeros

Os polímeros apresentam propriedades peculiares, que permitem a utilização desses materiais em diferentes tipos de artefatos. Além de serem bastante utilizados pela população também tem sido de grande interesse a sua utilização nos estudos científicos. O uso de polímeros naturais como as proteínas, a celulose e o amido como fontes alimentícias são comuns no cotidiano das mais diversas áreas, mas a utilização dos polímeros sintéticos como as borrachas, as resinas, os plásticos, os poliésteres, os nylons, os adesivos, dentre outros, também são cada vez mais comuns.

Segundo Stevens (1990), o nome polímero é derivado do grego *poli* que significa “muitos” e *meros* que significa “parte”, e como já foi mencionado antes, designado moléculas grandes (Macromoléculas). As macromoléculas são sinônimas de polímeros e são constituídas de unidades simples repetidas chamadas de monômeros. Se somente poucas unidades de monômeros são reunidas, o resultado é um polímero de baixo peso molecular denominado oligômero (*oligos* que significa “poucos”).

A representação de uma unidade formadora de cadeia é realizada dentro de colchetes ou parênteses, sendo referida como uma unidade repetitiva. A cadeia é formada pela junção de unidades monoméricas através do processo de polimerização (Steven, 1990).

Se o polímero é preparado de um simples monômero "A", o produto é referido como sendo um *homopolímero*. Se mais de um monômero é empregado, o produto final é um *copolímero* (Figura 2). Se monômeros "A" e "B" são polimerizados juntos, quatro arranjos são possíveis na estrutura polimérica. O primeiro arranjo é a alternância linear de duas unidades estruturais, chamado de *copolímero alternado*, mas se a distribuição for aleatória, o arranjo é chamado de *copolímero aleatório*. O terceiro arranjo é obtido se blocos "A" e "B" aparecerem juntos, sendo denominado de *copolímero em bloco*. Esse arranjo oferece um grande número de possibilidades. Finalmente, é formado um arranjo em bloco não linear, consistindo essencialmente de um polímero com ramificação de outro polímero. Este é denominado de *copolímero em arranjo* (Stevens, 1990).

-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-	Homopolímero
-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-	Copolímero Alternado
-A-A-B-A-B-B-A-B-A-A-B-A-B-A-A-B-	Copolímero Aleatório
-A-A-A-A-A-A-A-A-B-B-B-B-B-B-B-B-	Copolímero em Bloco
-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A- B B-B-B-B-B-B-B-B-B-	Copolímero em Arranjo

Figura 2 - Arranjos de acordo com a disposição dos monômeros (Stevens, 1990).

Os polímeros também podem ser definidos como sendo linear, ramificado e em rede (Figura 3). O polímero linear é aquele que não apresenta ramificações e nem grupos pendentos associados ao monômero, enquanto que o ramificado é aquele que apresenta estrutura igual ao copolímero em arranjo, mencionado anteriormente. Os polímeros em rede aparecem quando muitas cadeias poliméricas

são ligadas entre si, sendo denominados de polímeros reticulados. Devido a essa reticulação que forma uma rede tridimensional, o polímero possui resistência, rigidez e o material exibe um considerável grau de estabilidade dimensional.

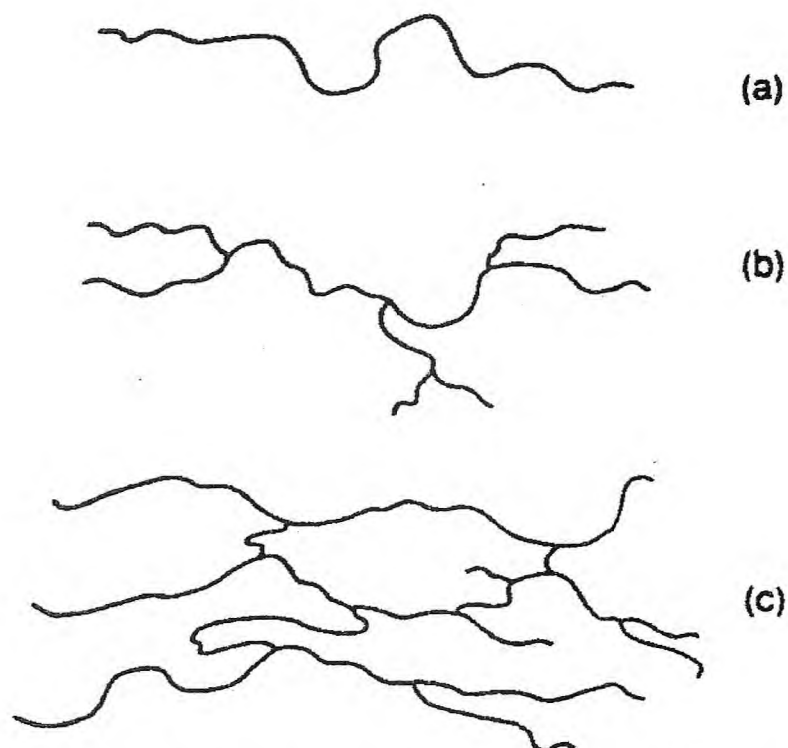


Figura 3 – Representação dos tipos de polímeros: a) linear, b) ramificado e c) em rede (Stevens, 1990).

1.1.2. Gomas

Gomas são moléculas de alta massa, hidrofóbicas ou hidrofílicas e geralmente apresentam propriedades coloidais. Elas estão inseridas na nomenclatura dos polímeros naturais (Churms *et. al.*, 1986). Mais recentemente as gomas têm sido definidas como sendo macromoléculas compostas de unidades repetitivas de açúcares simples (monossacarídeos) e, portanto, são chamadas de polissacarídeos (Brito, 2000).

Quando dissolvidas em solventes apropriados, produzem um gel ou suspensão altamente viscosa. Na indústria o termo goma está relacionado com polissacarídeos de origem vegetal ou microbiana e seus derivados, que são solubilizados em água fria ou quente, resultam em uma mistura viscosa (Whistler & BeMiller, 1993).

Inicialmente as gomas eram definidas com sendo um grande número de compostos que incluía polissacarídeos, terpenos, proteínas e polímeros sintéticos. Atualmente a definição de gomas é mais usada para polissacarídeos e seus derivados, que hidratam em água fria ou quente e formam soluções viscosas e dispersas (Paula, 1995). O fato de possuírem a propriedade de gelificar torna as gomas bastante utilizadas como estabilizantes e espessantes nas indústrias farmacêutica e de alimentos, por serem compostas principalmente por heteropolissacarídeos complexos, muitas vezes contendo compostos protéicos ligados a elas (Churms *et al*, 1986). As gomas naturais geralmente são insolúveis em solventes orgânicos, são hidrofílicas e se decompõem a elevadas temperaturas (Mantell, 1947).

As gomas têm tido aplicação em várias áreas, tais como indústrias de papéis, de tintas, de fósforos, nas tecelagens, dentre outras. Algumas gomas são utilizadas também na indústria de alimentos como espessantes de geleias, xaropes, saladas, maioneses etc. Na indústria de cosméticos as gomas são usadas nos fixadores de cabelos, cremes, pós compactos e outros produtos. Na indústria farmacêutica elas são usadas na preparação de mucilagens, emulsão, pastilhas etc. Na área biomédica, a utilização das gomas é limitada agindo como hidratante da pele e internamente como protetor das mucosas durante as inflamações (Mantell, 1947). As gomas naturais possuem vantagens sobre os polímeros sintéticos, geralmente porque elas não são tóxicas, são menos dispendiosas que as sintéticas e são obtidas de fontes renováveis. As gomas naturais também podem ser modificadas para serem utilizadas como sistema de liberação de drogas e desse modo competir com as gomas biodegradáveis disponíveis no mercado (Bhardwaj *et al.*, 2000).

Do ponto de vista estrutural, as gomas apresentam cadeias lineares ou ramificadas compostas de unidades glicosídicas, podendo apresentar de cem a mil unidades. Ao contrário do amido e da celulose, que são homoglicanas, compostos por apenas um tipo de unidades de açúcar, a glicose, as gomas, são heteroglicanas, constituídas por mais de um tipo de açúcar (Rosa, 2000). A Tabela 1 mostra alguns tipos de gomas comerciais classificadas quanto a sua natureza e origem.

As gomas ou polissacarídeos hidrossolúveis por serem biodegradáveis, extraídas de fontes renováveis e por apresentarem propriedades semelhantes aos polímeros sintéticos, vêm sendo alvo de muito interesse por parte das indústrias e de estudos científicos com o objetivo de encontrar novas gomas (Brito, 2000).

Tabela 1 – Classificação de algumas gomas comerciais.

Tipos	Origem	Goma	
Naturais	Exsudatos de plantas	Goma arábica	
		Goma caraia	
		Goma gatti	
		Goma de cajueiro	
		Goma de angico	
		Goma de alcatira	
		Goma tragacante	
		Algas	Alginato
			Ágar
	Carragenana		
	Sementes	Goma guar	
		Goma carob	
		Goma tara	
		Goma fenugreek	
		Goma carol	
Frutos		Pectina	
Fermentação microbiológica	Dextrana		
	Xantana		
	Gelana		
Modificadas	Celulose	Carboxi-metilcelulose Hidroxi-etilcelulose	
	Amido	Dextrina	
		Hidroxi-etil-amido	
	Produtos animais	Quitina	

Fonte: Rosa, 2000 & Melo, 2001.

A Tabela 2 mostra as aplicações das gomas hidrossolúveis na indústria alimentícia. As gomas atuam como estabilizantes, emulsificantes, floculantes, lubrificantes outros, dependendo de cada tipo de goma, pois apresentam propriedades individuais resultantes de suas estruturas moleculares (Whistler & BeMiller, 1993).

Tabela 2 – Gomas hidrossolúveis: funções e aplicações na indústria de alimentos.

Gomas	Funções	Aplicações
Goma guar	Estabilizante Retentor de água	Sorvetes, laticínios, Sobremesas, padarias
Alginatos	Estabilizante, Espessante, Agente encapsulante	Sorvetes, bebidas, Pudins
Ágar	Geleificante	Laticínios, confeitaria, Produtos de carne
Carragenanas	Estabilizante Espessante, Geleificante	Sorvetes, sobremesas, Flans, pudins, produtos de carne
Goma arábica	Estabilizante, Espessante, Emulsificante, Agente encapsulante	Confeitarias, padarias, Bebidas, molhos
Pectinas	Geleificante, Espessante, Estabilizante	Bebidas, geléias, confeitos, conservas, Confeitarias, laticínios
Goma tragacante	Estabilizante, Espessante, Emulsificante,	Laticínios, sobremesas, Molhos, confeitarias
Goma xantana	Estabilizante, Espessante	Sobremesas, bebidas, Laticínios

Fonte: Stephen&Churms, 1995.

1.1.2.1. Polissacarídeos de algas

Os polissacarídeos obtidos das algas podem ser agrupados em três classes: Os de reserva alimentar, os estruturais e os sulfatados (Kennedy & White, 1983). Entre os principais polissacarídeos da classe de reserva alimentar estão o amido e a laminarina, que são encontrados nas algas verdes, vermelhas e verde-azuladas. O amido é composto de amilose e amilopectina, enquanto que a laminarina é composta de D-glucana com uma seqüência linear de ligação (1→3) e (1→6) a resíduos de β -D-glucopiranosil, e de ocorrência principal nas algas pardas.

A segunda classe de polissacarídeos algais chamada de estrutural possui como componentes a celulose, que é bastante similar à celulose das plantas superiores, podendo chegar até 10% do peso seco das algas e é encontrada nas algas, pardas, vermelhas e verdes. Outro polissacarídeo dessa classe é o alginato, que é o principal componente comercial das algas pardas, sendo o mais importante polissacarídeo mucilaginoso que previne de dessecação as algas expostas ao ar e as marés

A terceira e última classe de polissacarídeos é a dos polissacarídeos sulfatados que são isoladas das algas marinhas vermelhas e pardas, o ágar e a carragenana que são extraídas das vermelhas e a fucoídiana isolada das algas pardas. (Kennedy & White, 1983). O ágar consiste de cadeias lineares formadas por resíduos de D-galactose e 3,6 anidrogactose e têm função estrutural dando flexibilidade ao tecido algal. A carragenana é um polissacarídeo linear também formado de β -D-galactose e α -D-galactose, com seqüências alternadas de (1→3) e (1→4) e produzem soluções altamente viscosas com estrutura muito similar à do ágar (Melo, 2001). A fucoídiana é um polissacarídeo com rendimento de 20 a 50% de peso seco de alga, é composto principalmente de α - (1→2) e /ou α - (1→3) ligados a resíduos de L-fucose, também podem conter resíduos de galactose, manose, xilose e ácido glucurônico. Quanto ao uso, o ágar é empregado em meios laboratoriais e na preparação de um alimento japonês, chamado de "Tokoroten" (Torres, 1998), e a carragenana como mencionada anteriormente (Tabela 2), é bastante utilizada na indústria alimentícia, na indústria de cosméticos, farmacêuticas e de tintas (Melo, 2001). A fucoídiana não é tóxica e é bastante utilizada na área farmacêutica, com atividades: antibacteriana, antiviral, antitumoral, anticoagulante, entre outras (Zvyagintseva *et al.*, 1999).

1.2. Alginatos

1.2.1. Histórico

O químico britânico E. C. C. Standford foi o primeiro a descrever os alginatos como a preparação de "ácido algínico de alga marrom", em uma patente datada de 12 de janeiro de 1881. Após essa patente, essa descoberta foi discutida em trabalhos publicados pelo autor no ano de 1883 (Standford, 1883 a, b). Ele acreditava que o ácido algínico continha nitrogênio e desta forma contribuiu muito para a elucidação da estrutura química desse composto.

Em 1926, alguns grupos trabalhando independentemente, (Atsuki & Tomoda, 1926; Schmidt & Vocke, 1926) descobriram que o ácido urônico era o constituinte do ácido algínico. A natureza dos ácidos urônicos presentes foi investigada por três diferentes grupos e mais tarde (Nelson & Cretcher, 1929, 1930, 1932, Bird & Haas, 1931), encontraram o ácido D-manurônico nos hidrolisados dos alginatos. A natureza das ligações entre resíduos do ácido urônico nas moléculas de alginato foram determinadas por ser β (1 \rightarrow 4), como na celulose (Hirst *et al.*, 1939). Estudando os ácidos urônicos e poliuronídeos por cromatografia de papel, Fischer & Dörfel (1955) detectaram a presença de um ácido urônico diferente do ácido manurônico, após a hidrólise do ácido algínico. Esse novo ácido urônico foi identificado como o L-gulurônico. A quantidade de ácido L-gulurônico foi considerável e um método para determinar quantitativamente os ácidos manurônico e gulurônico foi desenvolvido.

1.2.2. Ocorrência e Localização

Os alginatos são polissacarídeos que ocorrem como componentes estruturais em algas marinhas pardas e como polissacarídeos capsulares em bactérias do solo. Nas algas pardas o alginato é o mais abundante polissacarídeo, chegando a mais de 40% do peso seco algal (Moe *et al.*, 1995). Ele está localizado principalmente na matriz celular, mas provavelmente ocorre também na parede celular (Painter, 1998) e no seu estado nativo encontra-se como uma mistura de sais contendo os íons sódio, cálcio, magnésio, estrôncio e bário (Painter, 1998). Sua principal função é a de dar força e flexibilidade ao tecido algal. Devido a sua capacidade de geleificar, ter

uma elevada viscosidade e propriedades estabilizantes, o alginato é largamente usado industrialmente (Tabela 1).

As algas pardas constituem um grupo de algas marinhas mais conspícuas de águas temperadas. Apesar de existirem somente 1500 espécies, essas algas dominam os costões rochosos em todas as regiões mais frias do mundo (Raven, 1996). Em águas claras, as algas pardas ocorrem desde o nível de maré baixa até uma profundidade de 20 a 30 m. Mesmo nos trópicos, onde as algas pardas são menos comuns, ocorrem imensas massas flutuantes de *Sargassum*, em área como o Mar dos Sargaços (assim denominado devido à abundância de *Sargassum*) no Oceano Atlântico.

As algas pardas variam de tamanho, desde formas microscópicas até as maiores algas marinhas conhecidas (*kelps*). Suas células contêm clorofilas *a* e *c*, os cloroplastos também contêm vários carotenóides, incluindo uma grande quantidade de fucoxantina, que proporciona aos membros dessa divisão sua cor marrom-escura ou verde-oliva (Raven, 1996).

A alga marinha parda *Sargassum vulgare* C. Agardh é comumente encontrada no nordeste brasileiro e sua classificação foi realizada de acordo com a lista de checagem de espécies de Wynne, 1986, constando no quadro abaixo (Tabela 3):

Tabela 3 – Classificação de *Sargassum vulgare* C. Agardh.

Reino	Protista
Divisão	Phaeophyta
Ordem	Fucales
Família	Sargassaceae
Gênero	<i>Sargassum</i>
Espécie	<i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh

A espécie de alga marinha *Sargassum vulgare* mede de 25 a 30 cm, são de cor marrom, fixam-se ao substrato por apressório nítido, de onde nascem várias

frondes eretas, que são por sua vez ramificadas. Essas algas possuem eixos cilíndricos lisos, transportando ramos laterais alternadamente distintos e achatados, semelhante a folhas, são de forma elíptica lanceolada e medem até 6 cm de comprimento. Elas têm ainda uma distinta nervura central e margens nitidamente denteadas, medindo 16 mm de largura, podendo ou não apresentar bifurcação, e possuem flutuadores relativamente grandes, medindo até 7mm, de forma elíptica ou mais ou menos esféricos que neste caso, são de tamanho menor. A alga *Sargassum vulgare* habita os costões rochosos, especialmente onde há blocos de pedra soltas com muitas poças de água (Joly, 1967). Cresce em poças no nível inferior ao das marés, raramente ficando a descoberto (Figura 4).

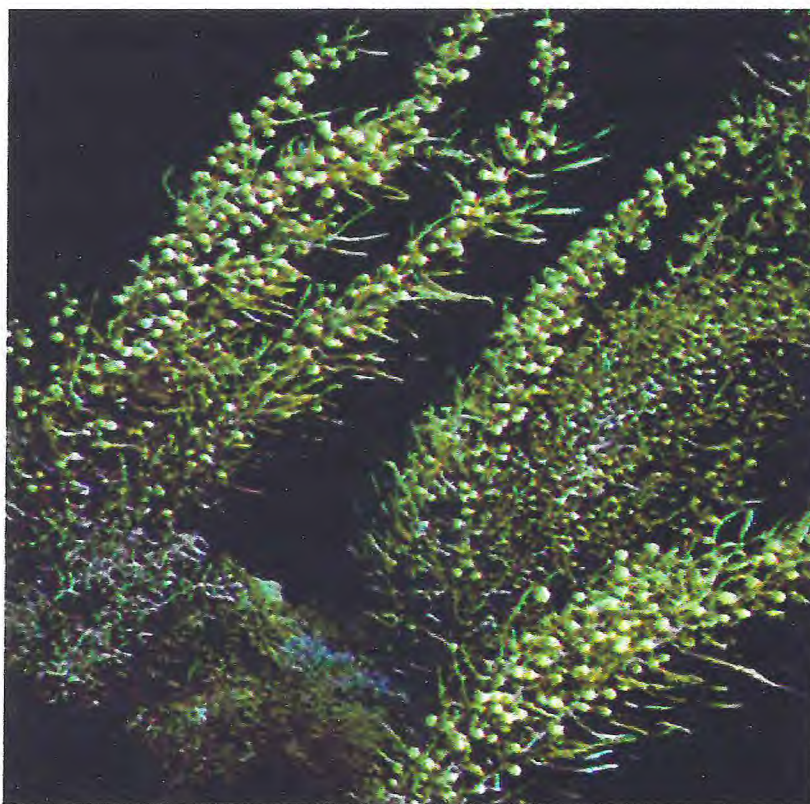


Figura 4 – Exemplar vivo de *Sargassum vulgare* C. Agardh.

Os alginatos exocelulares são produzidos por bactérias do solo como as *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter crococom* e algumas espécies de *Pseudomonas*. Os alginatos de bactérias têm sido analisados para serem utilizados como fontes de produção industrial, mas atualmente os alginatos comerciais mais utilizados ainda são os de algas (Moe *et. al.*, 1995).

1.2.3. Composição

Em termos moleculares o alginato é uma família de copolímeros binários não ramificados de ligação (1→4) de β-D- ácido manurônico (M) e (1→4) α-L- ácido gulurônico (Figura 2), variando enormemente em composição e seqüência estrutural (Moe, *et al.*, 1995). No passado acreditava-se que os alginatos eram homopolissacarídeo de manuronato, até que em 1955, Fisher & Dörfel, mostraram através de hidrólises, que alginatos comerciais e produzidos em laboratório continham ácido L-gulurônico além do ácido manurônico.

1.2.4. Seqüência

A primeira informação sobre a seqüência estrutural de alginatos surgiu a partir do trabalho de Haug (1964). Por hidrólise e fracionamento, eles foram capazes de separar alginato em três frações de composição muito diferentes. Duas das frações tinham como conteúdo moléculas homopoliméricas de ácidos gulurônico (G) e manurônico (M), respectivamente, em quanto a terceira fração continha proporções aproximadamente iguais de ambos os monômeros e foi observado um grande número de resíduos de dímeros MG. A partir dessas observações, concluiu-se que os alginatos eram, na verdade, copolímeros em bloco compostos de regiões homopoliméricas de M e G, chamados de blocos M e G respectivamente, intercalados com regiões de estrutura alternada (blocos MG). Mais tarde ainda, trabalhos usando degradação enzimática (Simionescu *et al.*, 1976; Boyd, & Turvey, 1978) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (Grasdalen *et al.*, 1981) mostraram que, na alternância dos blocos as seqüências GGM e MMG também estavam presentes (Figura 5).

1.2.5. Usos e aplicações

Os alginatos não têm nenhum valor nutricional, mas são bastante usados como aditivo para melhorar, modificar e estabilizar a textura de certos alimentos. Propriedades importantes incluem o aumento da viscosidade, a habilidade de formar gel e a estabilização de misturas aquosas e emulsões (Moe *et al.*, 1995).

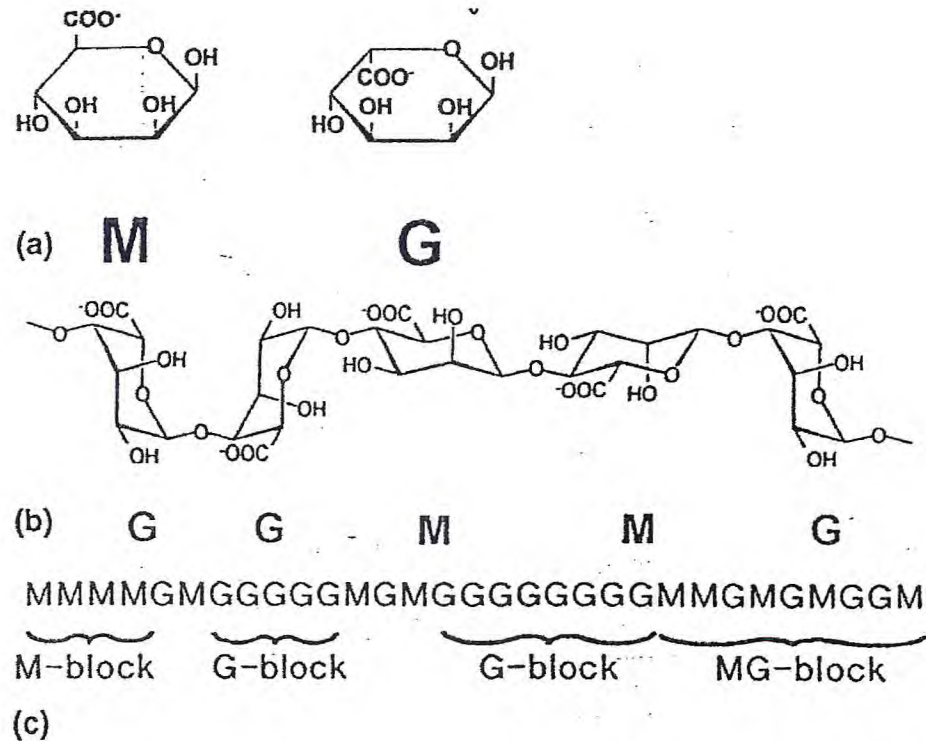


Figura 5 – Monômeros de alginato, a) conformação Haworth de M: β – D – manuronato; G: α – L – guluronato, b) cadeias de alginato na conformação cadeira, c) representação simbólica de uma cadeia de alginato, M: β – D – manuronato; G: α – L – guluronato (Moe et. al., 1995).

Os alginatos de sódio têm uma grande aplicação também na indústria de cosméticos, na área médica como regulador glicêmico, baixando os níveis de glicose em animais diabéticos, além de baixar o colesterol em estudos animais (Kimura *et. al.*, 1996). Na dentística são utilizados nas impressões dentárias.

O alginato de cálcio é bastante utilizado como um curativo de feridas exsudativas (Sayag *et. al.*, 1996), enquanto que o alginato de sódio, na presença de produtos antiácidos é efetivo no tratamento da doença de refluxo gastroesofageal (Mandel *et. al.*, 2000).

1.2.6. Alginato como carreador de agentes biológicos

Existe uma grande variedade de sistemas poliméricos naturais e sintéticos que têm sido investigados para liberar princípios ativos de forma controlada. Muitos desses processos empregados para incorporar os princípios dentro de matriz polimérica podem ter efeitos muito severos e causar desnaturação do agente ativo.

Por essa razão é que vários trabalhos estão sendo feitos para investigar inúmeros materiais poliméricos que apresentem melhores e mais adequadas características (Gombotz & Wee, 1998).

O alginato, como biopolímero natural das algas pardas, tem como propriedade rara a aptidão para ser usado como matriz para encapsulamento e/ou liberação de uma grande variedade de agentes biológicos. Essa propriedade inclui: i) independência de ambiente quando é usado como matriz; ii) promove encapsulamento suave à temperatura ambiente, livre de solventes orgânicos; iii) constitui um gel com alta porosidade o qual permite alta velocidade de difusão de macromoléculas; iv) capacidade de controlar esta porosidade com simples processo de cobertura e v) dissolução e biodegradação de sistemas abaixo das condições fisiológicas normais (Gombotz & Wee, 1998). O processo suave de geleificação do alginato, torna-o capaz de incorporar proteínas, células e DNA na matriz, com retenção de toda a atividade biológica. Além disso, a seleção do tipo de alginato e do agente a ser encapsulado, o tamanho do poro, a velocidade de degradação e finalmente a cinética de liberação podem ser controladas. Segundo Gombotz & Wee, 1998, géis de diferentes morfologias podem ser preparados e classificados em três tamanhos: matrizes em blocos largos; matrizes de esferas grandes (> 1 mm) e matrizes de microesferas ($< 0,2$ mm de diâmetro).

O alginato é um polímero bioadesivo que tem como vantagem fazer liberação no sítio específico de tecidos da mucosa. Essa propriedade associada à não imunogenicidade, tem conduzido a um aumento do uso desse polímero como um sistema de liberação de proteínas (Gombotz & Wee, 1998).

Em estudos há mais de 20 anos, o efeito adjuvante encontrado por intermédio da associação de antígenos com várias micropartículas poliméricas têm sido repetidamente demonstrada (O' Hagan, 1994). O efeito adjuvante das micropartículas pode está diretamente relacionado com a capacidade de capturar os macrófagos (Tabata & Ikada, 1990). Os polímeros poli(lactide) (PLA) e poli (lactide-co-glicolide) (PLG) são candidatos primários ao desenvolvimento de micropartículas para vacinas, por que são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Além disso, o PLG tem sido usado em humanos há muitos anos, como material de sutura e como sistema de liberação de drogas controlada para drogas peptídicas (Wise *et. al.*, 1979).

O efeito adjuvante humoral (produção de anticorpos e isotipos diferentes) encontrado pelo encapsulamento de antígenos em micropartículas biodegradáveis, de PLG tem sido demonstrado por Eldridge *et. al.*, 1991; O' Hagan *et. al.*, 1991. Estudos em camundongos mostraram que micropartículas também exercem um efeito adjuvante para a imunidade mediada por células, utilizando a indução de linfócitos T citotóxicos na resposta contra a ovalbumina ou gp120 de HIV-1, ambos através da administração sistêmica e mucosa (Maloy *et. al.*, 1994).

Uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia e uma resposta de potente proliferação de células T contra ovalbumina foram também detectadas após imunização, encapsulando o antígeno nessas partículas carreadoras (Maloy *et. al.*, 1994).

Como micropartículas com antígenos adsorvidos têm mostrado efetivo efeito adjuvante (O' Hagan *et. al.*, 1993, b), o encapsulamento de antígenos em macropartículas deverá permitir o uso das mesmas como sistema de liberação controlada com o potencial de desenvolver vacinas de dose-única. Todavia, a maior desvantagem desses polímeros é que eles geralmente degradam em ambientes extremamente ácido (pH 2-3), no qual muitos antígenos são encontrados, perdendo assim as suas integridades estruturais e antigênicas (Gander *et al.*, 1993; Schwendeman *et. al.*, 1996).

Estudos preliminares feitos por Jameela *et. al.*, (1996), demonstraram que a resposta imune humoral obtida em ratos imunizados com microesferas PLC (poli- ϵ -caprolactona) contendo BSA pela via intramuscular, apresentava valores superiores aos encontrados pelo adjuvante incompleto de Freund, nas mesmas condições.

O tamanho da partícula para imunização foi mostrado ser um importante parâmetro que afeta a imunogenicidade, por que micropartículas pequenas ($< 10 \mu\text{m}$) foram significativamente mais imunogênicas que partículas maiores ($>10 \mu\text{m}$) (Eldridge *et. al.*, 1991; O' Hagan *et. al.*, 1991). Apesar dos fatores que controlam a ligação das partículas sobre o trato gastrointestinal serem pobremente definidos, alguns estudos indicam que micropartículas com diâmetro menor que $10 \mu\text{m}$, utilizam-se das células M das placas de Peyer's nas administrações pela via oral (Eldridge *et. al.*, 1990).

Géis com alto conteúdo de blocos-G exibem alta porosidade, baixo encolhimento durante a formação do gel e baixa dilatação após a secagem, enquanto géis com um aumento na quantidade de blocos M ficam mais macios e

têm um menor tamanho de poro (Martinsen *et. al.*, 1989). Alguns exemplos de encapsulamento de células em alginato são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Exemplos de células imobilizadas no alginato.

Fonte	Células/Enzimas	Produtos/propósito
Enzima	Urease,	Estabilizante de enzimas,
	Fosfatase-alcálica	Estabilizante de enzimas
Bactéria	<i>Pseudomonas putida</i> ,	Remoção de H ₂ S,
	<i>Erwinia rhapsodici</i>	Isomaltulose
Algas azúis-esverdadas	<i>Anabena sp.</i>	Amônia
Fungos	<i>Aspergillus niger</i> ,	Ácido cítrico,
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Algas	Microalga, <i>Botryococcus braunii</i>	Criopreservação, Hidrocarbonos
Células de plantas	Cenoura,	Secagem artificial de sementes,
	<i>Digitalis lanata</i>	Digitoxinas
Células mamárias	Rh CSF-1 ou LM-10,	CSF-1,
	Hibridoma, Islets e Langerhans	Anticorpos monoclonais, Insulina

Fonte: Ertesvag & Vall, 1998.

1.3. O sistema imune

O termo imunidade é derivado do latim *immunitas*, e se referia à isenção de vários deveres cívicos e de processos legais oferecida aos senadores romanos durante seus mandatos. Historicamente, imunidade significava proteção contra doenças e, mais especificamente, contra doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o **sistema imune**, que protege o organismo dos danos causados por microorganismos invasores, bactérias, vírus, fungos e parasitas (Roit *et. al.*, 1997) e a resposta coletiva e coordenada dessas

células à introdução das substâncias estranhas é chamada de **resposta imune** (Abbas *et. al.*, 2000).

1.3.1. Resposta imune

A resposta imune é mediada por várias células e fatores solúveis, distribuídos de acordo com o tipo de imunidade, ou seja, **imunidade adquirida** (específica) e **imunidade inata** (natural) (Roit *et. al.*, 1997). Esses dois mecanismos constituem um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual numerosas células e moléculas funcionam cooperativamente (Abbas *et. al.*, 2000). Esses dois tipos de imunidade podem assim ser definidas:

- **Imunidade Adquirida:** é específica para o agente indutor e é marcada por uma resposta potencializada nos encontros subseqüentes do hospedeiro com o mesmo agente (antígeno). Assim, memória e especificidade constituem as principais características das respostas imunes adquiridas ou adaptativas (Roit *et. al.*, 1997).
- **Imunidade Inata:** é dependente de vários mecanismos imunológicos efetores, que não são específicos para um agente infeccioso em particular, não possuem memória e tem como componentes: 1) barreiras físicas e químicas como pele, epitélio mucoso, e substâncias antimicrobianas. 2) proteínas sangüíneas, como membros do complemento e mediadores da inflamação. 3) células fagocitárias (macrófagos, neutrófilos) e *células natural killers* ((Roit *et. al.*, 1997; Abbas, *et. al.*, 2000).

Com base nos componentes do sistema imune específico que funcionam como mediadores, as respostas imunes específicas são classificadas em dois tipos:

imunidade humoral e imunidade celular.

- **Imunidade Humoral:** é mediada por moléculas do sangue, responsáveis pelo reconhecimento específico e eliminação de antígenos. Essas moléculas são os anticorpos. A imunidade humoral pode ser transferida para indivíduos não-imunizados, através do plasma ou soro.
- **Imunidade Celular:** é mediada por células chamadas de linfócitos T. Pode ser transferida a indivíduos não-imunizados somente por meio de células de um indivíduo imunizado.

1.4. Via de imunização

A administração de vacinas através da rota das mucosas (oral, nasal, rectal, e inalatória), oferece algumas vantagens significativas sobre a via tradicional, da administração da vacina. Essas vantagens incluem: fácil administração; redução de parte dos efeitos colaterais; dispensa de pessoal treinado para administrar a vacina; não exige necessidade de reforços, devido à potencialização e à indução da unidade mucosa nos sítios iniciais de infecção (Benoit *et. al.*, 1999). Algumas vantagens e desvantagens de vacinas administradas pela via parenteral *versus* as vias oral e nasal podem ser observadas na Tabela 5.

1.5. Imunoadjuvantes

O termo "adjuvante" é derivado da palavra latina *adjuvare* o que significa ajuda, auxílio, potencialização. Adjuvante é todo material que ajuda os antígenos a aumentar a resposta imune humoral e/ou celular para esse antígeno (Gupta & Siber, 1995).

Os adjuvantes têm sido usados para aumentar a resposta imune de antígenos por aproximadamente 78 anos atrás, quando Ramon (1925, 1926), mostrou um aumento da resposta à antitoxina do tétano e ao toxóide da difteria quando injetados juntos com outros componentes como ágar, tapioca, lecitina, amido, óleo ou saponina.

Durante os últimos 78 anos, muitas formulações de adjuvantes têm sido desenvolvidas e poucas dessas têm sido avaliadas por testes clínicos (Edelman, 1980; Newman & Powell, 1995). Entretanto, muitas dessas formulações nunca foram aceitas para rotina de vacinação, principalmente devido a toxicidade e efeitos colaterais.

Segundo Jennings, 1995, os adjuvantes podem agir através de três mecanismos básicos de ação. Primeiro é o aumento do tempo de liberação do antígeno porque o adjuvante funciona como elemento de fixação do mesmo e essa longa exposição do antígeno aumenta o tempo da sua utilização pelo sistema imune para apresentar o antígeno a ser processado, bem como a duração da resposta do anticorpo. Como exemplos da condição descrita temos os lipossomas, compostos minerais, à base de óleos e micropartículas de polímeros biodegradáveis > 10 µm. O segundo mecanismo o da interação do adjuvante com células imunes, onde os

Tabela 5. – Vantagens e desvantagens de vacinas liberadas por via parenteral versus via oral e nasal.

	Parenteral	Nasal	Oral
Liberação	Injeção	Artifício de liberação	Ingestão simples
Risco de liberação	Possível Transmissão de infecções por seringas e agulhas contaminadas	Mínima, não requer seringas e agulhas	Mínima, não requer seringas e agulhas
Sistema de liberação/ adjuvante	O alumínio é o mais largamente utilizado, mas com variação nos sistemas efetivos	Requer adjuvante mucosal	Requer adjuvante mucosal
Dose do antígeno requerido	Baixa	Média	Alta
Resposta imune	Sistêmico potente para anticorpos e células T	Mucosal e sistêmico para anticorpos e células T, pode induzir tolerância	Mucosal e moderadamente sistêmico para anticorpos, pode induzir tolerância
Eficiência de proteção	Para muitos modelos animais e humanos, contra doenças virais, bacterianas e parasíticas	Para muitos modelos animais, contra doenças virais, e bacterianas	Para poucos modelos animais, contra doenças virais e bacterianas.
Uso clínico	Extensiva	Número limitado de testes clínicos	Número limitado de testes clínicos de subunidades, mas extensivo uso de vacinas atenuadas
Segurança	Nenhum problema com vacinas de subunidade, mas com sérios efeitos com vacinas mortas ou atenuadas.	Largamente desconhecida	Considerada ser a rota mais segura para liberação de vacinas

Fonte: Ryan *et al.*, 2001.

adjuvantes podem agir como vesícula liberadora de antígeno, entregando os antígenos alvo às células imunes competentes (exemplos: lipossomas, óleos, microesferas de polímeros biodegradáveis < 10 µm e polímeros em bloco não iônicos). O terceiro mecanismo seria dos adjuvantes aumentar a fagocitose dos macrófagos após ligação do antígeno com uma partícula (um carreador/ função de vesícula), como exemplos podemos citar: adjuvante completo de Freund's (FCA), lipopolissacarídeos (LPS), toxina pertussis (PT) etc.

De acordo com Bennett *et. al.*, 1992, os adjuvantes apresentam fatores que podem influenciar a resposta imune, entre eles podemos citar:

- O cuidado na preparação do antígeno (mistura-antígeno-adjuvante),
- O número de injeções utilizadas na imunização e a localização aplicada,
- O volume injetado por aplicação (não devem ser quantidades excessivas),
- As condições do animal (devem estar saudáveis e livres de doenças),
- O antígeno deve estar estéril (livre de contaminantes biológicos e químicos),
- Os antígenos não devem estar na forma ácida ou básica.

A resposta imune humoral pode ser modulada para selecionar o isotipo do anticorpo, subclasses IgG, avidéz e afinidade de anticorpos. Como as células T reconhecem antígenos através das células apresentadoras de antígenos juntamente com o complexo maior de histocompatibilidade (MHC), a forma do antígeno pode afetar não só o reconhecimento por parte das células T como também o tipo de células T (Neefies *et. al.*, 1991). O processamento de antígenos pode ser modulado por adjuvantes, ministrados em vacinas que podem tanto elicitar células T helper quanto linfócitos T citotóxicos (CTL).

Com o uso de adjuvantes, a resposta imune pode ser modulada para resposta do tipo MHC classe 1 ou o MHC classe 2 (Cooper, 1994). A resposta MHC classe 1 usualmente aparece em resposta a patógenos intracelulares, como vírus, conduzindo assim para o CTL. A resposta geralmente não é observada com antígenos protéicos ou peptídicos. Já adjuvantes como os complexos imunoestimulatórios (ISCOMS) e QS21 podem liberar CTL com proteínas, peptídeos ou vírus inativados (Gupta *et.al.*, 1993; Cooper, 1994; Takahashi *et. al.*, 1990; Wu, *et. al.*, 1992). Por outro lado, a resposta MHC classe 2 é usualmente induzida contra antígenos protéicos ou organismos inativados (Springs & koff, 1991; Paul, 1993).

Adjuvantes podem também modular a resposta imune para diferentes células T-helper (Th1 e Th2) (Audibert & Lise; 1993; Cooper, 1994; Golding, 1991; Martin *et. al.*, 1991). A resposta tipo Th1 é acompanhada por IL-2 e IFN γ e é usualmente observada após infecções virais, bacterianas intracelulares ou infecções parasitas ou ainda contra antígenos injetados como o vírus ativo (Coutelier *et. al.*, 1987). A estimulação da resposta do tipo Th1 conduz a uma resposta imune mediada por células e produção de níveis relativamente altos de anticorpos IgG2a em

camundongos. Em anos recentes algumas formulações de adjuvantes incluindo o adjuvante completo de Freund's (FCA) dipeptídeo muramil (MDP), lipopolissacarídeo (LPS), lipídeo A monofosforil (MPL), dentre outros, têm mostrado que estimulam a resposta tipo Th1 em camundongos (Allinson *et. al.*, 1990; Audibert *et. al.*, 1993; Cooper, 1994; Gupta & Siber, 1994). A resposta tipo Th2 é modulada pela IL-4 e IL-10 e é estimulada após imunização com antígenos protéicos ou organismos inativados. A estimulação da resposta Th2 leva a produção de anticorpos IgG1 e IgE em camundongos (Golding, 1991).

De acordo com Cox & Coulter (1997), os adjuvantes possuem não só três (Jennings, 1995), mas cinco modos de ação, como podem ser vistos na Tabela 6 e são classificados em dois grupos grandes: os particulados e os não particulados (Cox & Coulter, 1997).

Os adjuvantes particulados são aqueles que existem como partículas microscópicas e devem pelo menos algumas de suas atividades a esta propriedade. Os exemplos mais conhecidos são citados e descritos abaixo:

- **Sais de Alumínio:** Ocorre como sal insolúvel, gel precipitante de hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio, com tamanho da partícula que pode variar de 100 a 1000 nm. O imunógeno se liga por interação eletrostática na forma do pré-gel ou durante a formação do gel. Sais de alumínio têm sido largamente usados em vacinas humanas e veterinárias desde 1930 e induz fortemente as respostas Th2 e IgE.
- **Emulsões água-óleo:** são microgotas de água, estabilizadas por surfactantes, em fase de óleo. O adjuvante incompleto de Freund's (FIA) tem sido usado para vacinas humanas e veterinárias, mas tem baixa reatividade, induz fracamente a resposta para Th1 e Th2.
- **Emulsão óleo-água:** são microgotas de óleo, estabilizadas por surfactantes, em fase de água. Elas não são usadas como adjuvantes em vacinas humanas, estão freqüentemente associadas a imunomoduladores solúveis e Induzem fracamente as respostas Th1 e Th2. Um dos exemplos mais importantes que podemos citar é o adjuvante completo de Freund's (CFA) que é composto de óleo de parafina, monoesteato de manide e de micobactéria morta. Muito imunogênico.

Tabela 6 – Modos de ação de adjuvantes.

Ação	Tipo do Adjuvante	Benefício
1. Imunomodulação	Geralmente moléculas pequenas ou proteínas que modificam a rede de citocinas.	Regulação da resposta imune. Seleção de Th1 ou Th2
2. Apresentação	Moléculas geralmente anfipáticas ou complexos que interagem com imunógeno em sua conformação nativa.	Resposta aumentada de anticorpos neutralizantes. Maior duração da resposta
3. Indução de CTL	<ul style="list-style-type: none"> • Partículas que podem ligar ou englobar imunógeno e que podem fundir-se com ou romper membranas celulares. 	Processamento citossólico de proteína gerando peptídeos restritos classe 1 corretos.
	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsões água-óleo para o acoplamento direto de peptídeos a superfície da célula MHC-1. 	Processo simples se conhecidos os peptídeos promíscuos.
4. Mirar (targeting)	<ul style="list-style-type: none"> • Adjuvante particulado que ligam imunógeno. Adjuvantes que saturam células Kupffer. 	Uso eficiente de adjuvante e imunógeno.
	<ul style="list-style-type: none"> • Adjuvantes carboidratos tendo como alvo receptores de lectina em macrófagos e células dendríticas. 	Como acima. Pode também determinar tipo de resposta se é seletivo quanto ao objetivo.
5. Geração de depósito	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsão água-óleo por curto tempo. 	Eficiência.
	<ul style="list-style-type: none"> • Microesferas ou nanoesferas por longo tempo 	Potencial para vacina dose única.

Fonte: Cox & Coulter, 1997.

- **Complexos imune estimulados (ISCOM):** são constituídos por uma matriz de 40 nm resultando da interação de saponinas com colesterol e fosfolipídeos, e são imunogênicos quando incorporados a uma proteína. São usados em vacinas veterinárias e humanas. Induzem fortemente as respostas de Th1 e Th2 e excelente resposta a CTL.
- **Lipossomas:** são vesículas de membrana simples ou multilamelar bilateral, variando em tamanho de 20 nm a 3 µm. São usadas como imunógenos moléculas hidrofílicas e moléculas lipofílicas. Os lipossomas têm potencial para ser um bom alvo CTL.

- **Nano e micropartículas:** são partículas sólidas e pequenas, que variam de 10-1000 nm (nanopartículas) e 1-100 μm (micropartículas), formadas de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis. Podem agir como depósito de antígenos.
- **Proteossomos:** são agregados multiméricos com proteínas transmembranares de bactéria em uma estrutura anfipática. Não possuem atividade imunomodulatória.
- **Virossomos:** são como os proteossomos, mas com proteínas membranares derivados de vírus.

Os adjuvantes não-particulados são aqueles que a atividade não depende da natureza particulada ou multimérica, e são geralmente imunomoduladores. Os mais utilizados estão descritos abaixo:

- **Saponinas:** são misturas complexas de triterpenóides, com peso molecular em torno de 2000, induzem fortemente a resposta a Th1 e Th2 e moderada resposta a CTL. A Quil A é largamente usada em vacinas animais.
- **Lipídio A:** é um dissacarídeo de glucosamina com dois grupos fosfatos e cinco ou seis cadeias de ácidos graxos. Está sendo proposto para uso em vacinação humana. Induz fortemente a resposta de Th1.
- **Citocinas:** são glicoproteínas de peso molecular em torno de 20 kDa, utilizadas em vacinações humana e animal. Têm várias ações imunomoduladoras, em IL-1, IFN γ , IL-2, IL-4 e IL-12.
- **Polímeros de carboidratos:** Polímeros como os de manose (manana) e β - (1-3) glucose (glucanas, acemanana) têm sido proposto para uso em vacinação humana, quando misturados com o imunógeno. Podem estimular macrófagos, células dendríticas e regular o Th1.
- **Copolímeros em bloco não iônicos:** O peso varia entre 2500 e 12500. Diferentes polímeros são usados como aditivos para a fase óleo de emulsões óleo-água e água-óleo. Esses copolímeros não são biodegradáveis e possuem reatividade após administração das doses. Não têm atividade imunomodulatória.

1.6. Inflamação

A inflamação é a resposta dos tecidos à lesão, com a função de atrair moléculas séricas e células do sistema imune ao local lesado (Roit *et. al.*, 1997). A reação consiste de três componentes:

- Aumento do suprimento sangüíneo para a região,
- Aumento da permeabilidade capilar na área afetada,
- Emigração das células dos vasos sangüíneos para os tecidos.

Geralmente a invasão de um agente estranho a um tecido provoca uma resposta inflamatória local, desencadeada pelo mesmo, levando ao recrutamento de leucócitos para o local afetado. A inflamação consiste em eventos celulares e vasculares os quais são mediados por substâncias químicas, biologicamente ativas chamadas de mediadores da inflamação, como as aminas vasoativas (histaminas, serotoninas), fatores derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos), citocinas (interleucinas e quimiocinas), componentes do complemento, PAF (fator ativador de plaquetas), neuropeptídeos, radicais livres derivados do oxigênio e óxido nítrico (Tizard, 1998).

A inflamação é classificada de acordo com a severidade e quanto a duração, em **aguda e crônica**. A **inflamação aguda** é uma resposta imediata, que tem curta duração, sejam minutos, horas ou dias. Suas principais características são: a) alteração no calibre vascular levando a um aumento do fluxo sangüíneo local, b) exsudação de líquido e de proteínas plasmáticas, formando edema e c) emigração de leucócitos da microcirculação, principalmente neutrófilos, e seu acúmulo no foco da lesão. A inflamação crônica, ao contrário, tem maior duração e associa-se, em termos histológicos, com a presença de linfócitos e de macrófagos e com proliferação de vasos sangüíneos e de tecido conjuntivo (Williams, 1985).

Os principais sinais de inflamação são: o calor, a vermelhidão (rubor), o edema, a dor e por último a perda da função, esses sinais são conseqüentes de alterações vasculares (Tizard, 1998). Um dos principais eventos da inflamação, e mais imediato, é o aumento da permeabilidade vascular, que é resultante da dilatação de pequenos vasos, aumentando assim, o fluxo sangüíneo no local lesionado. Dessa maneira, o fluido se move dos vasos para os tecidos. Esse fluxo é responsável pelo edema, acúmulo de mediadores, extravasamento de proteínas plasmáticas e pela migração leucocitária (Contran *et al.*, 1999).

Os eventos celulares envolvem principalmente a migração de leucócitos e a liberação de substâncias ativas para o local lesionado. Essa migração é bastante específica, ou seja, os neutrófilos recorrem seletivamente ao sítio da inflamação aguda (Imhof & Dunon, 1995).

O tipo de leucócito que emigra varia com a idade da lesão inflamatória, assim como o tipo de estímulo. Os neutrófilos predominam na inflamação aguda durante as primeiras horas 6 e 24 horas, sendo substituídos por monócitos após 24 e 48 horas. Além disso, os neutrófilos possuem a curta duração, pois desintegram-se após 24 e 48 horas, enquanto que os monócitos sobrevivem por mais tempo (Dale & Foreman, 1988).

A emigração de leucócitos ocorre independentemente do aumento da permeabilidade vascular na inflamação aguda. Esse processo ocorre nas seguintes etapas: 1) intraluminais: marginalização, rolagem e adesão, 2) diapedese e 3) migração nos tecidos intersticiais na direção do estímulo quimiotático (Ross & Hellwell, 1994) (Figura 6).

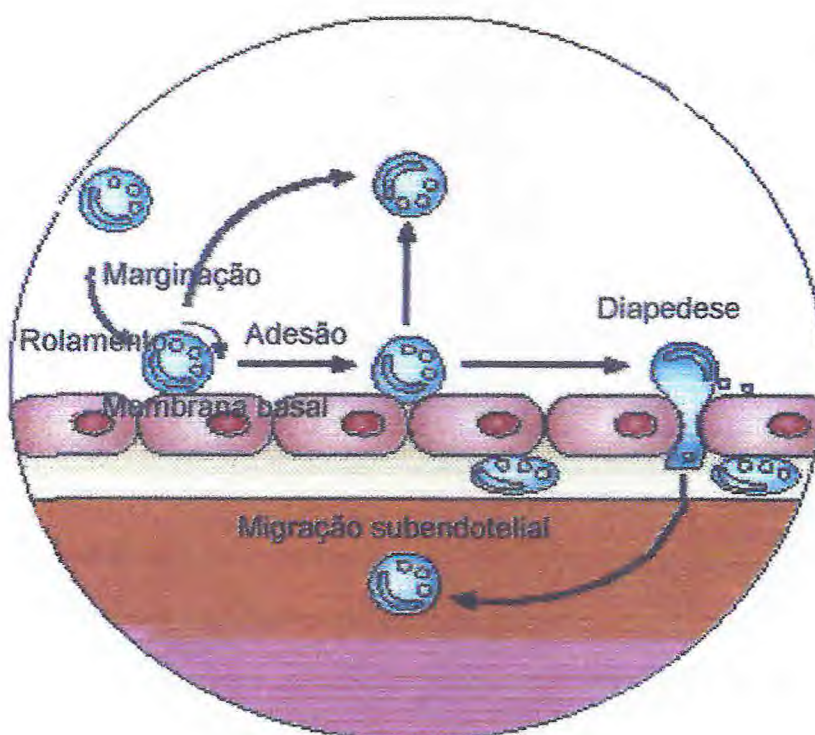


Figura 6 – Representação das etapas da migração celular (Salvemini *et. al.*, 2002).

No sangue que está fluindo normalmente, os eritrócitos e os leucócitos dentro dos microvasos estão confinados à coluna axial central, deixando uma camada de plasma relativamente livre de células em contato com a parede vascular. Com o aumento da permeabilidade vascular, os leucócitos saem da coluna central indo em direção das margens da superfície endotelial. Em seguida, os leucócitos isolados, e as fileiras de leucócitos deslocam-se lentamente ao longo do endotélio e aderem transitoriamente, em um processo chamado de rolagem e posteriormente se aderem ao endotélio. Após essa fase de adesão firme, o leucócito insere pseudópodos nas junções entre as células endoteliais, e passa através das junções em direção ao estímulo quimiotático (Butcher, 1991).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a capacidade imunoadjuvante de alginatos da alga marinha marrom *Sargassum vulgare*, com a possibilidade de sua utilização na produção de vacinas animais e/ou humanas.

2.2. Objetivos Específicos

- 2.2.1. Isolamento e caracterização físico-química de dois alginatos presentes na alga marinha *Sargassum vulgare*.
- 2.2.2. Utilização dos alginatos associados ou não a ovalbumina, para o estudo da resposta imunológica humoral de camundongos imunizados pela via subcutânea, oral e nasal.
- 2.2.3. Avaliar o efeito dos alginatos em três modelos de inflamação: migração celular por bolsa de ar subcutânea, migração celular por cavidade peritoneal e permeabilidade vascular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

3.1.1. Coleta e Acondicionamento das Algas Marinhas

As macroalgas marinhas marrons *Sargassum vulgare* foram coletadas em Agosto de 2001 na Praia do Pacheco, Caucaia- CE, no mesolitoral, em marés de sizígia (nível 0,0). As algas foram retiradas dos substratos recifais, colocadas em sacos plásticos, feita a limpeza para retirada de eventuais organismos epifitantes, e após serem lavadas com água destilada foram congeladas a -20°C até a sua utilização para obtenção dos extratos brutos.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos “swiss”, fêmeas, com idade entre 4 e 8 semanas, pesos médios de 28 a 30g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Foram também utilizados ratos albinos, machos adultos com pesos médios de 300g a 400g, igualmente provenientes do Biotério Central da UFC. Os animais foram mantidos em condições adequadas de luz e temperatura, e alimentados com ração padrão e água a vontade durante os experimentos.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Identificação das Espécies

Para identificação das espécies de macroalgas coletadas, foi utilizado chaves e descrições oriundas da lista de espécies de Wynne (1986).

3.3.2. Extração de alginatos da macroalga *Sargassum vulgare*

Os alginatos foram extraídos de *S. vulgare* de acordo com o método de Calumpang *et al.* (1999) com modificações. 300 g de algas secas à 60°C foram fixadas em formaldeído a 2% por 24h, lavadas com água destilada, imersas em uma

solução de HCl 0,2N por 24 h. Após a imersão em HCl as algas foram lavadas novamente em água e em seguida, foram adicionadas a uma solução de carbonato de sódio a 2%. As algas foram separadas em três amostras e aquecidas em banho-maria com agitação contínua em diferentes temperaturas 25°C, 60°C e 80°C. Alíquotas da solução formada de cada amostra foram coletadas em cinco diferentes tempos (1h, 2h, 3h, 4h, e 5h) e centrifugadas 6000 rpm, por 30 min à 4°C. Os resíduos foram descartados e os sobrenadantes foram utilizados como extratos brutos (Eb). Em seguida, cada alginato foi precipitado pela adição de etanol ao extrato bruto, lavado por duas vezes em acetona e seco com ar quente (Figura 7). Dois alginatos foram escolhidos para os estudos de caracterização estrutural, físico-químico e estudos imunológicos. Essas amostras de alginatos -V e +V foram purificadas após dissolução delas em água destilada, seguida por precipitação com etanol e o precipitado lavado duas vezes com acetona e seco com ar quente (Figura 7).

3.3.3. Determinação de Proteína

A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Bradford (1976). A concentração de proteínas para cada alginato purificado foi estimada utilizando-se como curva padrão de referência a albumina sérica bovina (BSA).

3.3.4. Determinação de Umidade

A umidade de cada amostra de alginato foi determinada segundo Melo *et al.*, 2002, com algumas modificações. Foi colocado 0,1mg de cada alginato em pesa-filtros previamente tarados para secar à temperatura de 105°C por 24 h. Após esse período, as amostras foram transferidas para um dessecador onde ficaram até o equilíbrio da temperatura ambiente e logo em seguida, foram pesados. O teor de umidade das amostras foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final e expresso em percentual.

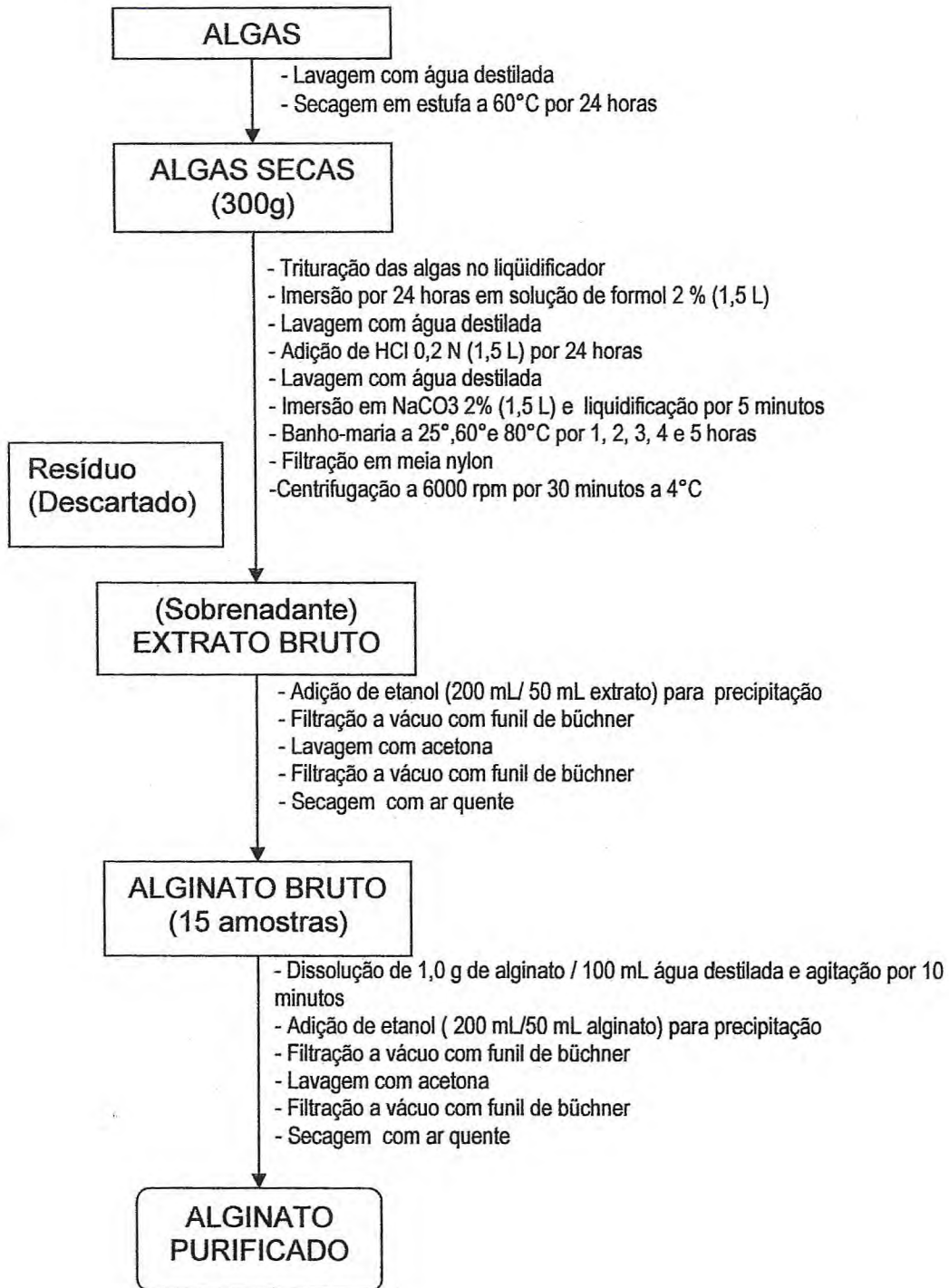


Figura 7 – Fluxograma do esquema de extração dos alginatos.

3.3.5. Determinação de Cinzas

O teor de cinzas foi determinado também segundo Melo *et al.*, 2002 com modificações. Cadinhos de porcelana em triplicata foram previamente tarados e 0,2g de cada alginato foi submetido a uma temperatura de 900°C por 24 h, para completa calcinação da matéria orgânica. Posteriormente, o material foi mantido em dessecador até a temperatura ficar estável para a realização da pesagem. O conteúdo de cinzas foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final das amostras e expresso em porcentagem.

3.3.6. Determinação de Microelementos

A microanálise elementar foi realizada nas amostras de alginatos purificados -V e +V, para determinar o teor de nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre. A determinação quantitativa de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foi realizada em um microanalisador C,H,N, S/O Carlos Erba, Model 1110 com combustão a 1000°C em atmosfera de oxigênio. Um detector de condutividade térmica. (Gurgel Filho *et al.*, 2003).

3.3.7. Determinação da Viscosidade Intrínseca

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ dos alginatos -V e +V foi realizada de acordo com Melo *et al.*, 2002. As viscosidades das amostras de alginato foram efetuadas na presença de NaCl 0,1 M (solvente), na concentração de 3mg/mL, previamente filtrados em funil de büchner e as medidas do tempo de escoamento das soluções de carboidratos e do solvente foram feitas em um viscosímetro capilar, UBBELOHDE, com um diâmetro de 0,5 mm. A temperatura de análise foi mantida a 25°C \pm 0,1°C. Os tempos de escoamento foram medidos em cronômetro Technos e o controle de temperatura realizado através de um banho termostatizado modelo FANEM. Foram realizadas 5 medidas do tempo de escoamento para cada concentração.

3.3.8. Geleificação

As propriedades de geleificação das amostras de alginatos -V e +V foram determinados de acordo com Oliveira *et. al.*, (2001). Amostras com concentrações percentuais de 5, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 de alginatos -V e 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 15 para alginatos +V foram incubadas em banho-maria com temperaturas que variaram de 10°C à 80°C. As temperaturas de transição gel-sol foram obtidas pelo método visual que consistia da temperatura na qual o gel firme começava a fluir. A verificação era realizada em intervalos de 5°C. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.9. Determinação da Fluorescência

O espectro de fluorescência foi obtido em um espectrofluorímetro HITACHI F-2000, seguindo o protocolo de Skjaek-Braek *et. al* (1989) como citado por Klock, G., (1994). As frações de alginato -V e +V foram dissolvidas em água destilada na concentração de 1 % (p/v) e filtradas em filtros de membranas milipore (0,2 µm). A excitação aplicada foi de 366 nm e sinais de emissão foram dados de 380 a 600 nm.

3.3.10. Determinação da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel.

A massa molar no pico (M_{pk}) das amostras de alginatos foi estimada através de cromatografia de permeação em gel utilizando um equipamento SHIMADZU acoplado a um detector de índice de refração. Uma coluna ultrahydrogel linear de 7,8 x 3000 nm com fase móvel NaNO_3 0,1 M e fluxo de 0,5 mL/min foram utilizados. Amostras de 0,008 g de cada alginato foram dissolvidas em 1 ml de água e 1 ml de NaNO_3 0,2 M e em seguida alíquotas de 50 µl foram aplicadas na coluna. A curva de calibração foi construída utilizando padrões de pululana com massas molares de 5.9, 11.8, 47.3, 212, e 788 kDa. (Paula *et. al.*, 2001).

3.3.11. Determinações Reológicas

O comportamento reológico das amostras de alginatos foram estudados em reômetro BROOKFIEL Modelo DV III a temperatura de 25°C variando a concentração das soluções de 0,1 a 1 % em NaCl 0,1 M. As soluções foram filtradas em filtros de membranas 0,2 μm e 1 ml de cada amostra foi analisada. O efeito da temperatura no comportamento de fluxo também foi investigado. (Oliveira *et. al.*, 2001).

3.3.12. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Foram realizados espectros na região do infravermelho na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , em espectrofotômetro SHIMADZU FT IR-8500, para os dois alginatos purificados -V e +V em pastilhas de KBr.

3.3.13. Hidrólise ácida Parcial

Os dois alginatos purificados -V e +V foram submetidos a hidrólise ácida com HCl nas seguintes condições:

a) 100 mg de cada amostra foi solubilizada em 50 mL de água destilada e o pH ajustado a 5,0 com HCl 0,02 M. Em seguida, essas soluções foram fervidas por 15 minutos em um balão com uma coluna de refluxo. Após esse período, as soluções foram resfriadas e o pH novamente ajustado, agora para 3,6 com HCl 0,02 M. As amostras foram novamente fervidas, agora por mais 25 minutos, liofilizadas e levadas para análise em RMN (Chandía *et. al.*, 2001).

3.3.14. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H das duas frações hidrolisadas e liofilizadas dos alginatos solubilizadas em água deuterada, foram

obtidos no aparelho BRUKER modelo AVANCE-DRX- 500 à 40°C, utilizando como padrão interno de acetona (31,07 ppm) (Panikkar & Brasch, 1996).

3.3.15. Uso de Alginatos como Imunoadjuvantes

3.3.15.1. Preparação da mistura de alginatos com e sem ovalbumina para utilização em via subcutânea

7,5 mg de alginato foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de ovalbumina 2,5 mg/5 mL de salina estéril, e mantida em agitação até a homogeneização total. Os alginatos associados a ovalbumina foram filtrados em filtros de membrana milipore (0,2 μ m) e foram utilizados como adjuvantes associados a ovalbumina em imunizações bem como nos reforços. Os alginatos sem a ovalbumina foram filtrados em filtros de membrana milipore (0,2 μ m) e foram utilizados como controles em imunizações bem como nos reforços.

3.3.15.2. Preparação da mistura de alginatos com e sem ovalbumina para utilização em via oral

Soluções estoques de ovalbumina foram confeccionadas na concentração de 25 mg/50 mL de salina estéril. Dessa solução retirou-se 25 mL e foram feitas duas novas soluções, adicionando-se 75 mg de cada alginato para total solubilização. Após serem homogeneizados em um agitador, foram filtrados em filtros de membrana milipore (0,2 μ m) e em seguida aliquotados, congelados e utilizados nas imunizações posteriormente.

3.3.15.3. Preparação da mistura de alginatos em gel com e sem ovalbumina para utilização em via oral

200 mg de cada alginato foram dissolvidos em 20 mL de água destilada e gelificado em 10 mL de CaCl₂ 0,01M. Após esse procedimento, os alginatos foram filtrados em membrana de milipore 0,2 μ m, congelados e utilizados nas imunizações. Para os alginatos associados a ovalbumina utilizou-se 200 mg de alginato

solubilizado em 20 mL de solução estoque de ovalbumina 25 mg/50 mL de salina estéril.

3.3.15.4. Preparação da mistura de alginatos com e sem ovalbumina para utilização em via nasal

15 mg de cada alginato foi dissolvido em 3 mL de solução de ovalbumina (4,5 mg/9 mL de salina estéril), em seguida, foram homogeneizados, filtrados em membranas de milipore 0,2 μm , aliquotados e também congelados para uso posterior.

3.3.15.5. Imunização por via subcutânea com ovalbumina associada ou não aos alginatos purificados -V e +V

Foram utilizados 6 grupos de 5 camundongos que foram submetidos a imunizações subcutâneas na região dorsal, com a ovalbumina na concentração de 100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ associada ou não aos alginatos (adjuvantes) nas concentrações de 1 mg/200 μL de cada alginato (-V e +V). Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

- a) Ovalbumina (100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$),
- b) Ovalbumina (100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$) + alginato -V (1 mg/200 μL),
- c) Ovalbumina (100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$) + alginato +V (1 mg/200 μL),
- d) Ovalbumina (100 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$) + Hidróxido de alumínio (1 mg/200 μL).

Os animais foram imunizados com 200 μL de cada amostra e receberam reforços com 21 e 35 dias após o início da imunização. Os camundongos foram sangrados com pipetas Pasteur por punção no plexo-retro-orbital, para obtenção dos antissoros, com 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após o início da imunização.

3.3.15.6. Imunização por via oral com ovalbumina associada ou não aos alginatos purificados -V e +V

Foram utilizados 6 grupos de 5 camundongos para as imunizações orais. Os grupos e doses utilizadas foram:

- a) Ovalbumina (100 µg/200 µL),
- b) Ovalbumina (100 µg/200 µL) + alginato -V (1 mg/200 µL),
- c) Ovalbumina (100 µg/200 µL) + alginato +V (1 mg/200 µL),
- d) Alginato -V (1 mg/200 µL),
- e) Alginato +V (1 mg/200 µL),
- f) Salina (NaCl 0,15 M).

Os animais receberam por via oral 200 µL de cada tratamento, durante dez dias com um intervalo de dois dias após o quinto dia. Os animais receberam reforços nas mesmas condições com 20 e 25 dias após o início da imunização. As amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital dos camundongos, com 5, 10, 15, 30 e 45 dias após o início da imunização.

3.3.15.7. Imunização por via nasal com ovalbumina associada ou não aos alginatos purificados -V e +V

Diferentes grupos de camundongos (6 grupos de 5 animais) foram imunizados por via nasal com 20 µL de acordo com os grupos testes, sendo 10 µL em cada narina, por 10 dias (sendo 5 dias seguidos com um intervalo de 2 dias, seguido de mais 5 doses de 5 dias) e reforços foram dados aos 20 e 25 dias após o início da imunização, nas mesmas condições iniciais. Os grupos testados foram:

- a) Ovalbumina (10 µg/20 µL),
- b) Ovalbumina (10 µg/20 µL) + alginato -V (100 µg/20 µL),
- c) Ovalbumina (10 µg/20 µL) + alginato +V (100 µg/20 µL),
- d) Salina (NaCl 0,15 M).

Alíquotas de sangue foram colhidas do plexo retro-orbital, para obtenção dos soros com 5, 10, 15, 30 e 45 dias.

3.3.15.8. Imunização por via oral com ovalbumina associada ou não aos alginatos purificados -V e +V gelificados

Foram imunizados 6 grupos de 5 camundongos por via oral com ovalbumina associada ou não aos géis de alginatos purificados -V e +V. Para formar os géis utilizamos 200 mg de cada alginato dissolvido em 20 mL de água destilada e adicionamos 10 mL de CaCl_2 0,01 M, com agitação constante até a total homogeneização dos géis. Após a obtenção dos géis fez-se as imunizações adicionando-se ou não a ovalbumina de acordo com os grupos:

- a) Ovalbumina (100 μg /200 μL)
- b) Ovalbumina (100 μg /200 μL) + alginato -V (1 mg/200 μL) gelificado,
- c) Ovalbumina (100 μg /200 μL) + alginato +V (1 mg/200 μL) gelificado,
- d) Alginato -V (1 mg/200 μL) gelificado,
- e) Alginato +V (1 mg/200 μL) gelificado,
- f) Salina (NaCl 0,15 M).

Os animais receberam por via oral 200 μL de cada tratamento, durante dez dias com um intervalo de dois dias após o quinto dia. Os animais receberam reforços nas mesmas condições com 20 e 25 dias após o início da imunização. As amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital dos camundongos, com 5, 10, 15, 30 e 45 dias após o início da imunização.

3.3.16. Obtenção dos antissoros

O sangue dos camundongos imunizados foi coletado por punção no plexo retro-orbital, com pipetas Pasteur. Amostras individuais de sangue foram deixadas em repouso por uma hora à temperatura ambiente para retração do coágulo. O soro foi recolhido e centrifugado a 3.000 g por 10 minutos, para que estivesse livre das hemácias. Os soros obtidos foram armazenados a -20°C e utilizados posteriormente na dosagem de anticorpos específicos.

3.3.17. Testes Sorológicos:

3.3.17.1. Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Os anticorpos específicos para a ovalbumina foram submetidos a testes de ELISA indiretos. Para os ensaios dos antissoros para as vias subcutânea e nasal, foram utilizadas placas (U96- POLYSORP-NUNC-IMMUNO PLATE BATCH 016181) com 96 poços, sensibilizadas com ovalbumina (5 μ g/orifício). Os ensaios de ELISA para as vias: oral e oral-gel utilizamos para sensibilizar as placas a ovalbumina (5 μ g/orifício) e também alginatos (-V e +V) nas mesmas concentrações. Todos esses antígenos foram diluídos em salina (NaCl 0,15 M) e aplicados 100 μ L por poço. As placas foram incubadas overnight a temperatura de 4°C e após o período de aderência do antígeno à placa, foram feitas três lavagens com PBS-Tween-20 0,05%. Em seguida as placas foram bloqueadas com PBS-Molico a 5% por 2 h à 37°C e lavadas novamente com PBS-Tween-20 0,05% (três vezes). Após a lavagem, as placas foram então incubadas overnight na temperatura de 4°C, com diluições dos anticorpos (obtidos das imunizações) que variaram de 1:10 a 1:1280. Após o período de reação antígeno-anticorpo, as placas foram lavadas novamente, como descrito anteriormente e foram incubadas com o conjugado imunoglobulinas anti-mouse (Dako Nº P 260. DK-2600 Glostrup Denmark) ligadas a peroxidase, em uma diluição de 1:1000 durante 2h à 37°C. A seguir, as placas foram lavadas e adicionado o substrato cromógeno o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD), por um período de 30 minutos à 25°C. A intensidade da reação foi avaliada espectrofotometricamente no comprimento de onda 492nm no aparelho de leitura Elisa Labystems Multiskam MS.

3.3.17.2. Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)

Os títulos de anticorpos da classe IgE presentes em soro de camundongos, foram determinados por PCA de acordo com o método de Ovary (1952), modificado por Mota & Wong (1969). Os títulos foram calculados como logaritmo na base 2 do

inverso da diluição máxima do antissoro ($D_{m\acute{a}x}$), com capacidade de provocar uma reação cutânea positiva.

Título: $\text{Log}_2 1/D_{m\acute{a}x}$

3.3.17.2.1. PCA para IgE

Os títulos dos antissoros da classe IgE foram determinados por PCA em ratos albinos machos adultos com pesos médios entre 300 e 400g. A região dorsal da pele dos animais foi depilada após anestesia com halotano. Pontos foram marcados na pele dos animais e injeções (100 μl) contendo os anticorpos diluídos com salina 0,15 M estéril nas proporções $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$, foram administrados intradermicamente. Após um período de 24 h, cada animal recebeu 1 ml de uma solução 1 mg de ovalbumina contendo azul de Evans 0,5% em salina 0,15 M. Após 30 minutos, os ratos foram sacrificados com halotano e a pele foi dessecada para a leitura da reação. Todos os experimentos das diferentes vias foram testados por esse método, a única diferença ocorreu nas vias: oral e oral-gel, que tiveram os alginatos -V e +V adicionados (1mg de cada) na solução de revelação.

3.3.18. Atividade Tóxica (DL-50)

A atividade tóxica, segundo Vasconcelos *et al.*, 1994, representa a quantidade de proteína em mg/kg de peso corpóreo de camundongo, capaz de produzir convulsões e morte em 50% dos animais quando injetados por via intraperitoneal (ip). Para a avaliação da toxicidade aguda pela via ip, foram utilizados camundongos pesando entre 20 e 30g, alimentados *ad libitum* com ração peletizada comercial e água à vontade. Soluções dos alginatos purificados (-V e +V foram confeccionadas, nas concentrações de 2,5% em salina e grupos (2) de animais (5) foram injetados com 300 μL de cada solução de alginato/10g de camundongo, utilizando como grupo controle a salina (NaCl 0,15M). O comportamento dos animais foi observado por 6h consecutivas e depois até completar o período de 24h.

3.3.19. Efeito dos alginatos -V e +V de *S. vulgare* sobre a migração celular para a bolsa de ar subcutânea em camundongos

De acordo com o método de Edwards *et al.*, 1981, com modificações, bolsas de ar subcutâneas (BAS) foram feitas em grupos de 10 camundongos. Primeiramente os animais foram depilados no dorso, e no local aplicou-se 1ml de ar estéril para a indução da bolsa de ar subcutânea (BAS). Na BAS formada, injetou-se 0,5 mL dos diferentes alginatos -V e +V na concentração de 1% em salina estéril após serem filtrados em filtro de membrana 0,2 μm . A migração dos neutrófilos e macrófagos foi avaliada nos tempos de 4, 8, 16, 24, 48 e 72 h da aplicação do estímulo. Para tanto, a BAS foi lavada através da injeção de 1 mL de PBS contendo 20 U de heparina. Do líquido recuperado uma alíquota de 50 μL foi retida para contagem de leucócitos totais, enquanto que o restante foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram acrescentados 200 μL de PBS, o qual foi utilizado na confecção de lâminas para a contagem diferencial dos leucócitos. A contagem dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer, na diluição (1:10) de 50 μL do exsudato em 450 μL de solução de TURK. A lâminas utilizadas para a contagem diferencial dos leucócitos foram produzidas colocando uma alíquota de 100 μL do precipitado em uma centrifuga citospin por 5 minutos a 800 rpm. Após a centrifugação, as lâminas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa e a contagem diferencial foi feita levando-se em conta os diferentes tipos de células: neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, ao microscópio óptico. O número de cada tipo celular foi calculado a partir do percentual encontrado em relação ao número total de células.

3.3.20. Efeito dos alginatos purificados -V e +V de *S. vulgare* sobre a migração de neutrófilos e macrófagos para a cavidade peritoneal em camundongos.

A migração de leucócitos totais e diferenciais para a cavidade peritoneal de camundongos foi realizada pelo método de Souza *et al.*, 1988. Os animais (n=10) foram testados de acordo com os seguintes grupos: animais que receberam 300 μL de: alginato – viscoso ou + viscoso (1% em salina estéril), animais com indometacina

(10 mg/ kg de animal), indometacina mais alginato – viscoso, indometacina mais alginato + viscoso e salina (NaCl 0,15 M). Nos grupos que possuíam associação de testes (indometacina e alginatos), primeiro fez-se a aplicação da indometacina, seguida (alguns minutos depois) pela aplicação dos alginatos em lados diferentes do animal. A migração celular foi realizada por um período de 4 e 24 h da aplicação dos tratamentos e após esses tempos os animais foram sacrificados com halotano, seguida de uma lavagem da cavidade peritoneal de cada camundongo com 2 mL de salina estéril contendo heparina (80 μ L heparina/20 mL salina). Nesse exsudato, empregou-se a mesma metodologia para a obtenção dos leucócitos totais e diferenciais do item anterior (2.3.20).

3.3.21. Efeito dos alginatos purificados -V e +V de *S. vulgare* sobre o influxo de proteína na cavidade peritoneal em camundongos

Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação da lavagem da cavidade peritoneal nos tempos de 4 e 24 h foram analisados para quantificação de proteínas totais, segundo o método de Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina sérica bovina (BSA).

3.3.22. Efeito dos alginatos purificados -V e +V de *S. vulgare* sobre a permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos

Estudos sobre os efeitos dos alginatos -V e +V na inflamação aguda foram realizados através do teste de permeabilidade vascular induzida por ácido acético segundo Whittle (1964). Os grupos de animais (n=10) testados receberam 300 μ L de solução/animal e foram os seguintes: grupos dos alginatos–viscoso (1% em salina) ou +viscoso (1% em salina), indometacina (10 mg/Kg de animal), indometacina mais alginato – viscoso, indometacina mais alginato + viscoso e o grupo da salina (NaCl 0,15 M). As foi administrado por via i.p. e após 30 minutos, cada animal recebeu uma injeção endovenosa de solução a 1% de Azul de Evans (0,1 mL/10 g de peso corpóreo). Após 60 minutos do início do experimento, foi injetada na cavidade peritoneal 0,1 mL/10 g de peso corpóreo uma solução de ácido acético 0,6% em

salina estéril. Passados 20 minutos, os camundongos foram sacrificados com halotano e a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL da salina que foi injetada com auxílio de uma seringa. O lavado (exsudato) foi coletado com uma pipeta Pasteur e colocado em tubos. Para clarificação da turbidez do exsudato devido a presença de proteínas, adicionou-se 0,1 mL de uma solução de NaOH 1N em cada tubo, e a absorbância medida a 595nm em espectrofotômetro. A permeabilidade vascular foi expressa em quantidade total de corante que migrou para a cavidade peritoneal ($\mu\text{g}/\text{camundongo}$).

3.3.23. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio e analisados por análise de variância (ANOVA). Todos os cálculos foram realizados usando o programa **SAS** (Statistic Analysis System) e as diferenças significativas entre os tratamentos foram determinados utilizando o teste de Turkey ($p < 0,05$) após transformação logarítmica, com exceção do experimento de migração celular (n° de macrófago) e do experimento de bolsa de ar (n° de macrófago), que apresentaram comportamento de testes não-paramétricos, sendo utilizado assim, o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extrações dos alginatos

As extrações dos alginatos foram monitoradas com o tempo e à temperatura ambiente, bem como a 60°C e 80°C. O rendimento dos alginatos aumentou com o aumento da temperatura de extração (Figura 8) entre 1 e 3 horas de extração, entretanto rendimento similar foi obtido com 60°C e 80°C após 4 horas de extração. O maior valor de rendimento foi obtido com 5 horas (16,9%). Aumentos de temperaturas de 25 para 60 e 80°C resultam em um incremento de rendimento de cerca de 40%. Após 5 horas, a Tabela 7 mostra uma comparação de rendimento de alginatos de diferentes fontes. Como podemos observar o rendimento do alginato de *S.vulgare* é menor que outras espécies algais, mas comparando com espécies do gênero *Sargassum*, o rendimento apresentou um valor médio maior que a das outras espécies, com exceção da *Sargassum filipendula*.

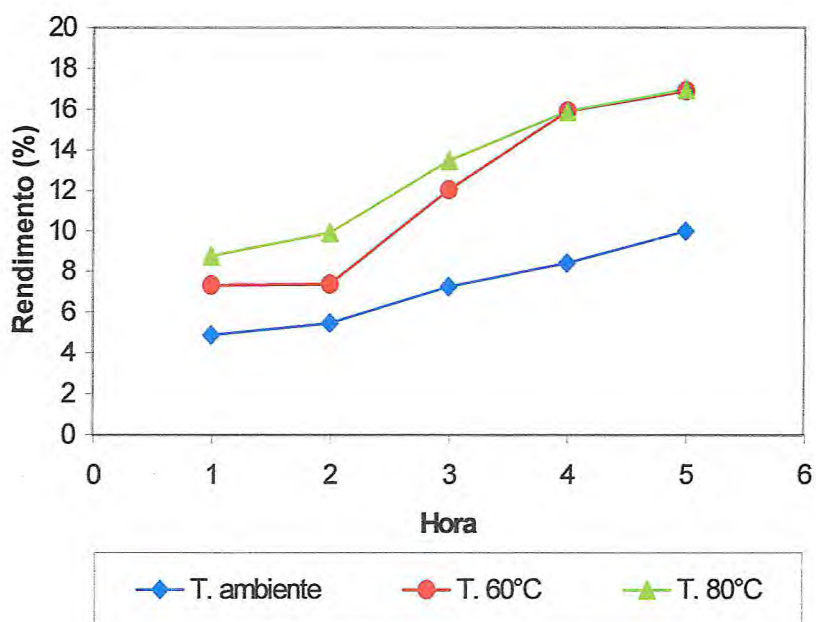


Figura 8 – Rendimento das frações de alginatos de *Sargassum vulgare* nas diferentes temperaturas e tempos de extração.

Tabela 7 – Rendimento dos alginatos de espécies de algas marinhas marrons.

Espécies	Rendimento (%)	Referências
<i>Sargassum</i>		
• <i>filipendula</i>	13,3 –23,5	Davis,F. W., 1950
• <i>fluitans</i>	6,8	Davis,F. W., 1950
• <i>natans</i>	9,0	Davis,F. W., 1950
• <i>vulgare</i>	16,9	Este trabalho
• <i>feldmannii</i>	1,8	Calumpong <i>et al.</i> (1999)
• <i>ilicifolium</i>	0,5	Calumpong <i>et al.</i> (1999)
• <i>polycystum</i>	1,35	Calumpong <i>et al.</i> (1999)
• <i>cristaefolium</i>	1,7	Calumpong <i>et al.</i> (1999)
<i>Macrocystis</i>		
• <i>pyrifera</i>	19,4- 21,9	Herdandez–Carmona <i>et al.</i> (1999)
<i>Durvillaea</i>		
• <i>antartica</i>	44	Pannikar <i>et al.</i> (1996)
• <i>patotorum</i>	55	Pannikar <i>et al.</i> (1996)
• <i>willana</i>	61	Pannikar <i>et al.</i> (1996)

4.2. Viscosidade específica das frações dos alginatos

A viscosidade específica das soluções de extração durante a extração foi também monitorada ao longo do tempo (Figura 9). A viscosidade específica das soluções aumentou com o aumento de temperatura, provavelmente devido à dissolução de alginatos. Este procedimento é diferente daquele observado para alginatos de *Macrocystis pyrifera* (Herdanández-Carmona *et al.*, 1999) onde a viscosidade decresce com o aumento da temperatura de extração. Amostras extraídas a 60°C com 1 e 5 horas foram selecionadas para posterior caracterização. Elas foram denominadas de menos viscoso (-V) e mais viscoso (+V) respectivamente.

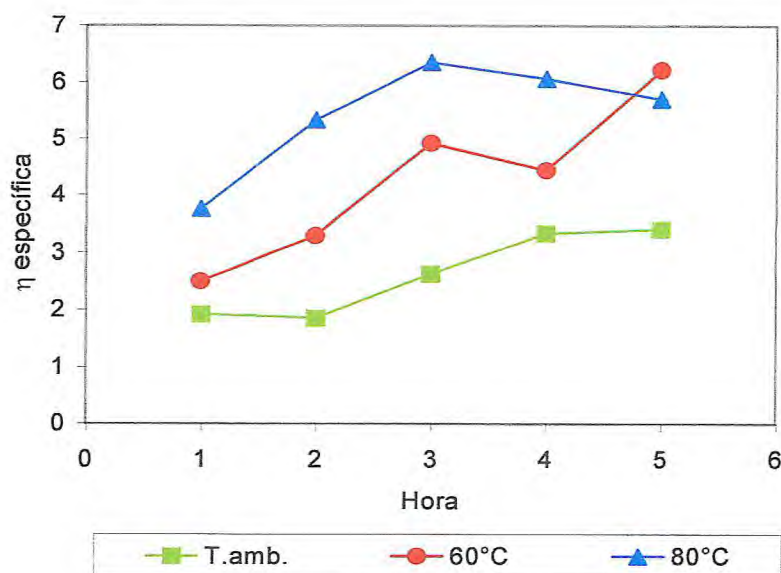


Figura 9 – Viscosidade específica das frações de alginato de *S. vulgare* nas diferentes temperaturas e tempos de extração.

4.3. Determinação do Teor de Umidade e de Cinzas

O teor de umidade das duas frações de alginato obtido a 105°C, foi de 14% para o -V e 16% para o +V (Tabela 8). De acordo com Melo (2002), foram encontrados valores de umidade próximos para carboidratos sulfatados das algas vermelhas *Gracilaria cornea* (11,6%) e *Agardhiella ramossissima* (12,7%). Também segundo, Rosa (2000), a goma bruta de sementes de *Parkinsonia aculeata*, apresentou um valor de umidade próximo aos alginatos, de 13,5%. O teor de cinzas, obtido pela queima das duas frações de alginato em mufla a 900°C, foi de 2 % para o -V e 1% para o +V (Tabela 8).

Tabela 8 – Determinação de teores de umidade e cinzas por incineração dos dois alginatos de *Sargassum vulgare*.

Alginato	Umidade (%)	Cinzas (%)
Menos viscoso (-V)	14	2
Mais viscoso (+V)	16	1

4.4. Determinação do Teor de Proteínas

O teor de proteínas, para os dois alginatos -V e +V, foi realizado pelo método de Bradford (1976). Os valores encontrados foram muito semelhantes entre si, onde para o alginato -V obtivemos o valor de 1,0 %, enquanto que para o +V foi de 1,3% (Tabela 9). Os valores de proteínas encontrados para os alginatos são coerentes com os apresentados por Melo (2001), onde os carboidratos extraídos da alga marinha vermelha *Agardhiella ramossisima* continha cerca de 1,06% de proteína, obtido através do método de Micro-kjeldahl (Pearson, 1973).

4.5. Análise elementar

A Tabela 9 mostra os percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre para os dois alginatos (-V e +V). Como podemos observar, os valores de carbono, hidrogênio e enxofre foram muito semelhantes entre os dois alginatos. Os teores de nitrogênio também foram muito semelhantes entre si e foram determinados como sendo 0,17799 % para o -V e 0,16377% para o +V. A partir desses valores calculamos o teor de proteína para ambas as frações através da percentagem do nitrogênio ($\%N \times 6,25$). Esses valores de proteína encontrados foram coerentes com os obtidos pelo método de Bradford (1976),

Tabela 9 – Determinação do potencial de íons e proteína dos dois alginatos de *Sargassum vulgare*.

Alginato	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)	Proteína (%N \times 6,25)	Proteína Bradford (%)
Menos viscoso (-V)	0,17799	27,667	5,15	0	1,1	1,0
Mais viscoso (+V)	0,16377	28,090	4,49	0	1,02	1,3

4.6. Determinação da Fluorescência

O grau de purificação dos alginatos foi testado por espectro de fluorescência. Por este método, impurezas polifenólicas presentes em muitos alginatos podem ser facilmente detectadas (Skjaek-Braek *et. al.*, 1989). Como é observado na Figura 10, os dois alginatos de *S. vulgare* mostraram uma presença contínua de resíduos que exibiram emissão na faixa de 450nm. Se compararmos a intensidade de fluorescência real dos alginatos -V e +V, brutos e purificados, podemos observar que houve um decréscimo de 52,7% da fase bruta para a purificada em ambas as amostras. Esses valores são consistentes com os valores obtido por Orive *et. al.*, (2001) em alginato de *L. hyperborea* (63%). Segundo Klöck *et. al.*, (1997), os contaminantes remanescentes encontrados no espectro de fluorescência de alginatos de *D. potatorum*, não puderam ser identificados, mas testes de biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, mostraram que essas impurezas não foram capazes de produzir anticorpos contra os alginatos.

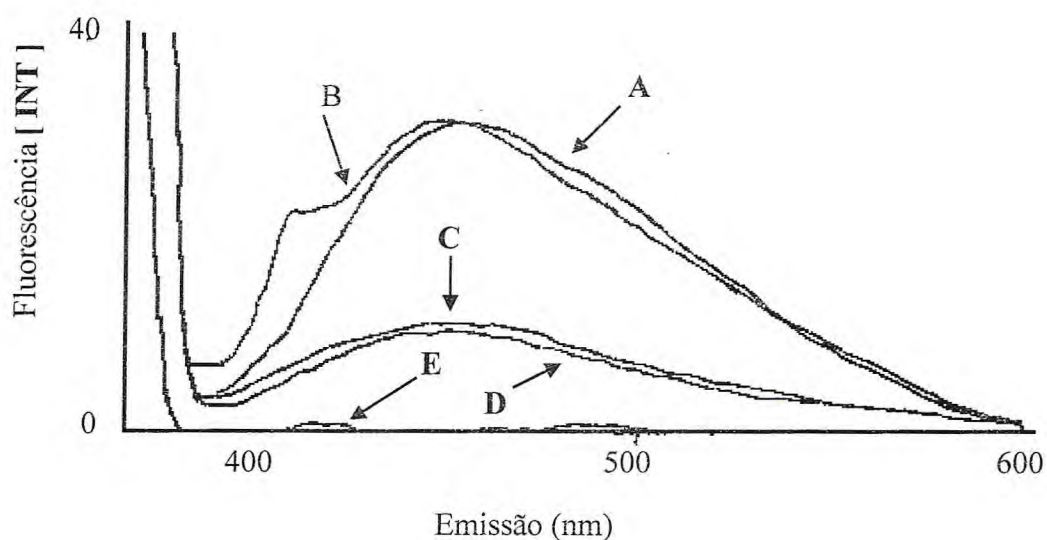


Figura 10 – Espectro de fluorescência dos alginatos de *Sargassum vulgare*. A) alginato bruto +V, B) alginato bruto -V, C) alginato purificado +V, D) alginato purificado -V e E) solvente (água).

4.7. Determinação da Viscosidade Intrínseca dos Alginatos

A viscosidade intrínseca é uma medida hidrodinâmica do volume ocupado pelas macromoléculas a diluições infinitas em uma dada temperatura e solvente. Ela é dependente do peso molecular, da composição e da seqüência dos resíduos de ácidos manurônicos (M) e ácidos gulurônicos (G), bem como da força iônica e pode ser definida pela equação de Huggins como:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c$$

Equação 1

A viscosidade intrínseca foi determinada por regressão linear da viscosidade reduzida *versus* a concentração, "c", quando tende a 0. A curva linear foi obtida para as duas amostras de alginato de *S. vulgare*, e a equação clássica pode ser aplicada. Todavia, Mancini *et. al.*, 1996, mostraram que para as algas pardas *M. pyrifera* e *L. Hyperborea* existia uma relação não linear entre a redução de viscosidade e a concentração e devido a isso, a viscosidade foi calculada usando uma regressão exponencial. As viscosidades intrínsecas do alginato mais viscoso (+V) e do menos viscoso (-V) foram respectivamente 9,10 e 5,26 dL/g em NaCl 0,1 M a 25°C (Figuras 11 e 12, respectivamente). A Tabela 10 mostra uma comparação das viscosidades intrínseca $[\eta]$ de alginatos de diferentes fontes algais.

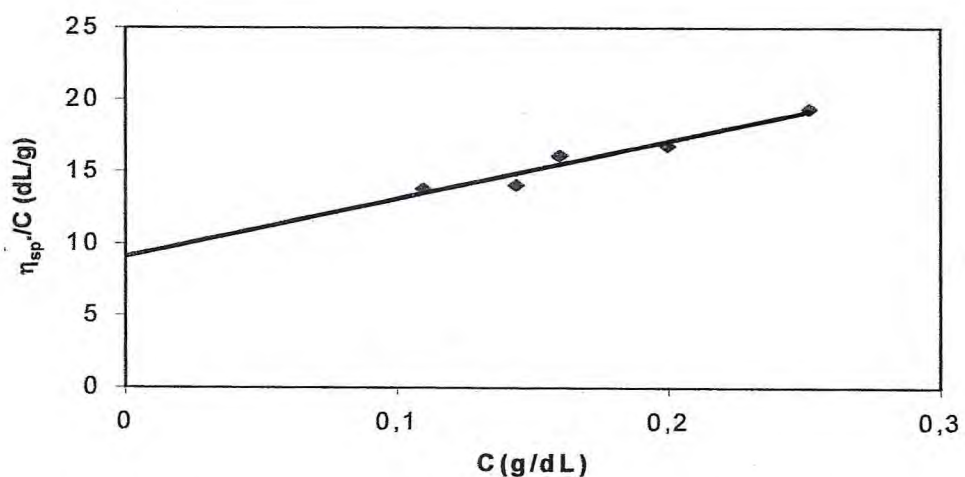


Figura 11 – Viscosidade intrínseca do alginato mais viscoso (+V), em NaCl 0,1M e temperatura de 25°C.

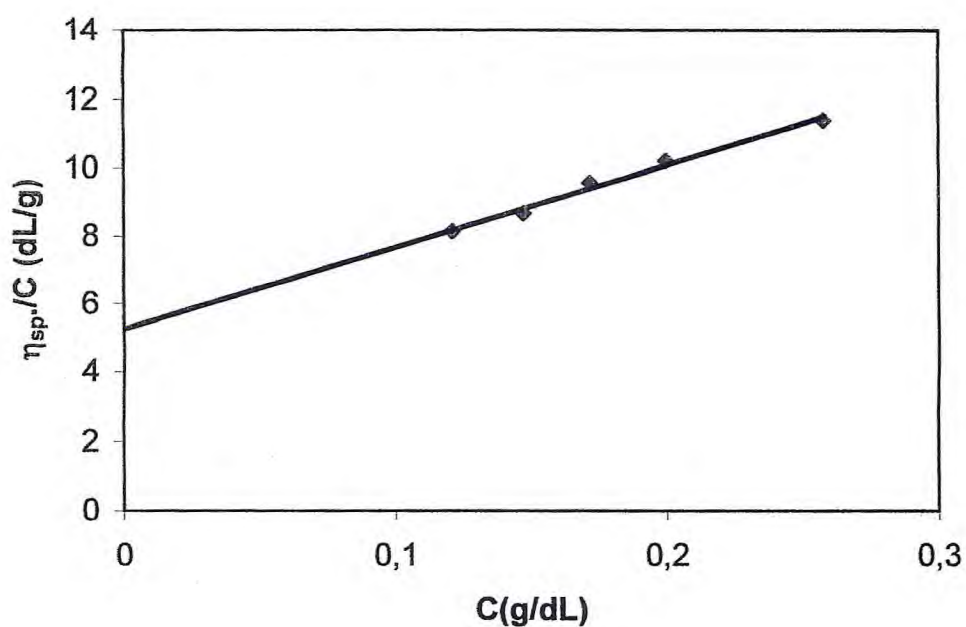


Figura 12 – Viscosidade intrínseca do alginato menos viscoso (-V), em NaCl 0,1M e temperatura de 25°C.

Tabela 10 – Comparação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ de alginatos provenientes de diferentes fontes de algas.

Fonte de alginatos	$[\eta]$ (dL/g)	Referências
<i>Macrocystis pyrifera</i>		
• HV	12,1	Clementi <i>et. al.</i> ,1998
• MV	9,6	Clementi <i>et. al.</i> ,1998
• LV	6,20	Clementi <i>et. al.</i> ,1998
<i>L. hiperborea</i>	6,4	Clementi <i>et. al.</i> ,1998
<i>L.hiperborea</i>	7,1	Martinsen <i>et. al.</i> ,1991
<i>F.vesiculosus</i>	2,5	Fourest & Volesky,1997
<i>A. nodosum</i>	2,8	Fourest & Volesky,1997
<i>L. japonica</i>	15,4	Fourest & Volesky,1997
<i>S. fluitan</i>	6,3	Fourest & Volesky,1997
<i>S. vulgare</i>		
• +V	9,10	Este trabalho
• -V	5,26	Este trabalho

Com o aumento da concentração dos polissacarídeos, o efeito de interação entre as moléculas começa a predominar. Essas mudanças na interação são refletidas nas mudanças do parâmetro de declínio da viscosidade de Huggins, k_H . O valor usual de k_H fica entre 0,33 e 0,80 (Elias, 1997). A constante de Huggins para o alginato -V apresentou um valor em torno de 0,48, enquanto que o k_H do +V foi de 0,87, ficando então fora da faixa mencionada.

A massa molar dos alginatos pode ser obtida pela equação de Mark-Houwink:

$$[\eta] = kM^a$$

Equação 2

Onde,

K e a são coeficientes empíricos característicos do polímero e do sistema solvente-temperatura. Para os alginatos os valores de a variam entre 0,73 e 1,31 e podem ser obtidos dependendo da força iônica e da composição do alginato (Moe *et al.*, 1995). Altos valores são típicos de alginatos ricos em cadeias G, enquanto que valores baixos são observados em alginatos ricos em cadeias M, os quais são mais flexíveis (Martisen *et al.*, 1991 & Moe *et al.*, 1995). A Tabela 11 mostra os valores de a de alguns alginatos algais a 0,1 M de NaCl.

Tabela 11 – Valores de a de alguns alginatos algais.

Fonte de alginato	Valor de a	Referências
<i>L. hiperborea</i>	1,11	Mackie <i>et al.</i> , 1980
<i>F. vesiculosus</i>	1,00	Mackie <i>et al.</i> , 1980
<i>L. hiperborea</i>	1,13	Martinsen <i>et al.</i> , 1991
<i>M. pyrifera</i>	0,92	Martinsen <i>et al.</i> , 1991
<i>L. digitada</i>	1,00	Mackie <i>et al.</i> , 1980

Clementi *et. al.*, 1998 propuseram duas relações empíricas para a viscosidade $[\eta]$ e a massa molar levando em consideração alginatos de cinco fontes.

$$[\eta] = 0,023M_w^{0,984}$$

Equação 3

$$[\eta] = 0,095M_n^{0,963}$$

Equação 4

Os valores de M_w e M_n para as duas amostras de alginato de *Sargassum vulgare*, foram estimados pelas equações 3 e 4 (Tabela 12) e apresentaram os valores de $M_w = 4,46 \times 10^4$ g/mol para o +V e $2,63 \times 10^4$ g/mol para o -V, enquanto que os valores de M_n foram de $1,35 \times 10^4$ g/mol para o +V e de $0,76 \times 10^4$ g/mol para o -V. Os valores de M_w e de M_n de diferentes fontes de alginatos estão listados na Tabela 12 para comparação usando dados de $[\eta]$ da Tabela 10 e equações 3 e 4. Os valores de M_w e M_n encontrados para *S. vulgare* são similares aos alginatos de média e baixa viscosidade obtidos da alga marinha *M. pyrifera*.

Curvas de escoamento de soluções aquosas de alginatos de sódio de alta e baixa viscosidade de *S. vulgare* foram obtidas entre 0,1 e 1,0 g/dL em NaCl 0,1 M (Figura 13 e 14). No modelo Power-Law, o comportamento da solução pode ser descrita por :

$$\tau = m\gamma^n$$

Equação 5

Onde,

m é o índice de consistência ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$), n é o índice de comportamento do fluido, τ é a tensão de cisalhamento e o γ é a taxa de cisalhamento. Os parâmetros m e n podem ser obtidos por regressão linear (Stephen, 1995; Marcotte *et. al.*, 2001). Se o gráfico da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento à temperatura e pressão constantes for linear, a viscosidade será constante e igual ao coeficiente angular da reta, à este tipo de comportamento é denominado de líquido Newtoniano.

Tabela 12 – Valores de Mw e Mn de diferentes alginatos de algas.

Fonte de alginato	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)
<i>M. pyrifera</i>		
• HV	$6,03 \times 10^4$	$1,78 \times 10^4$
• MV	$4,79 \times 10^4$	$1,41 \times 10^4$
• LV	$3,09 \times 10^4$	$0,89 \times 10^4$
<i>L. hiperborea</i>	$3,16 \times 10^4$	$0,91 \times 10^4$
<i>L. hiperborea</i>	$3,55 \times 10^4$	$1,02 \times 10^4$
<i>M. pyrifera</i>	$2,69 \times 10^4$	$0,78 \times 10^4$
<i>F. vesiculosus</i>	$1,20 \times 10^4$	$0,35 \times 10^4$
<i>A. nodosum</i>	$1,38 \times 10^4$	$0,39 \times 10^4$
<i>L. japonica</i>	$7,58 \times 10^4$	$0,89 \times 10^4$
<i>S. fluitans</i>	$3,09 \times 10^4$	$2,29 \times 10^4$
<i>S. vulgare</i>		
• +V	$4,46 \times 10^4$	$1,35 \times 10^4$
• -V	$2,63 \times 10^4$	$0,76 \times 10^4$

Os valores de índice de consistência e índice de escoamento foram calculadas usando o modelo Power-Law para as soluções de alginatos (-V e +V) e o comportamento Newtoniano foi observado para o alginato -V nas concentrações de 0,1 a 0,7%, enquanto que para o alginato +V as concentrações com o comportamento Newtoniano foram de 0,1% a 0,5%, utilizando a mesma faixa da taxa de cisalhamento (Figura 13 e 14).

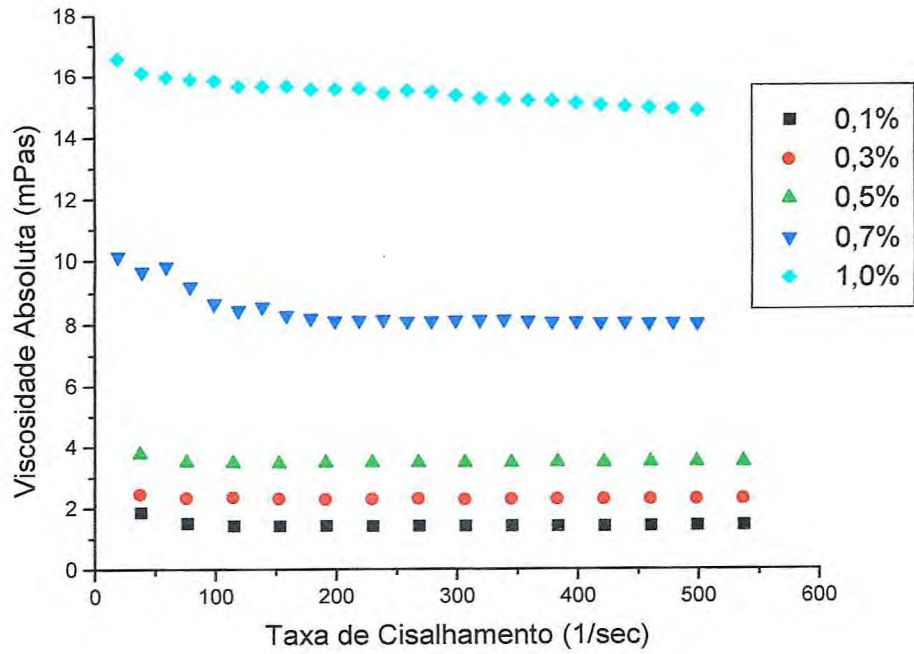


Figura 13 – Comportamento reológico do alginato +V em diferentes concentrações, em NaCl 0,1M.

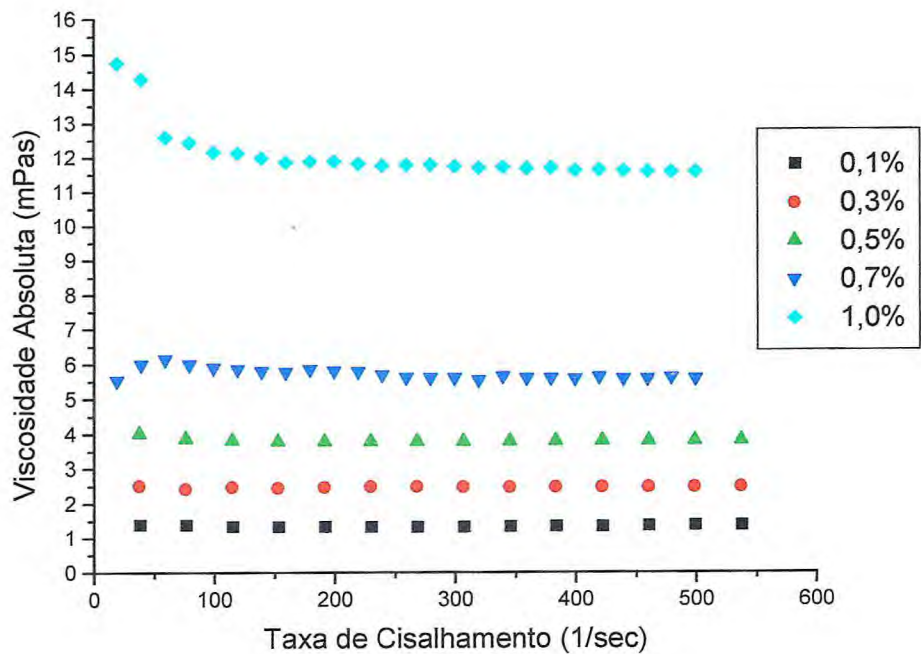


Figura 14 – Comportamento reológico do alginato -V em diferentes concentrações, em NaCl 0,1M.

4.8. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.

Os espectros de infravermelho (Figuras 15 e 16) obtidos para o alginato -V e o +V de *Sargassum vulgare*, foram muito semelhantes nas regiões entre 1100-1025 cm^{-1} e entre 960-800 cm^{-1} que são as regiões de resíduos anoméricos características dos alginatos. A Tabela 13 apresenta as principais bandas de absorção características dos polissacarídeos (alginatos) das algas pardas.

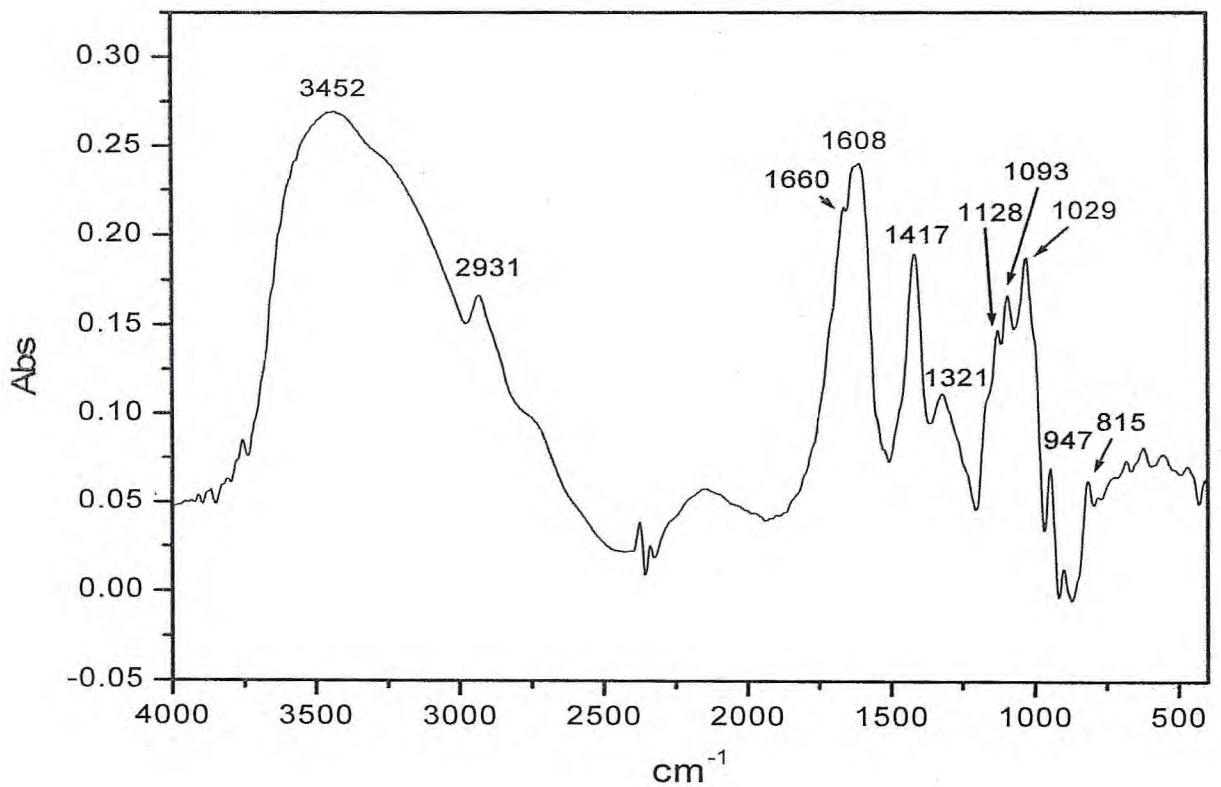


Figura 15 – Espectro na região de infravermelho do alginato -V de *Sargassum vulgare* em pastilhas de KBr.

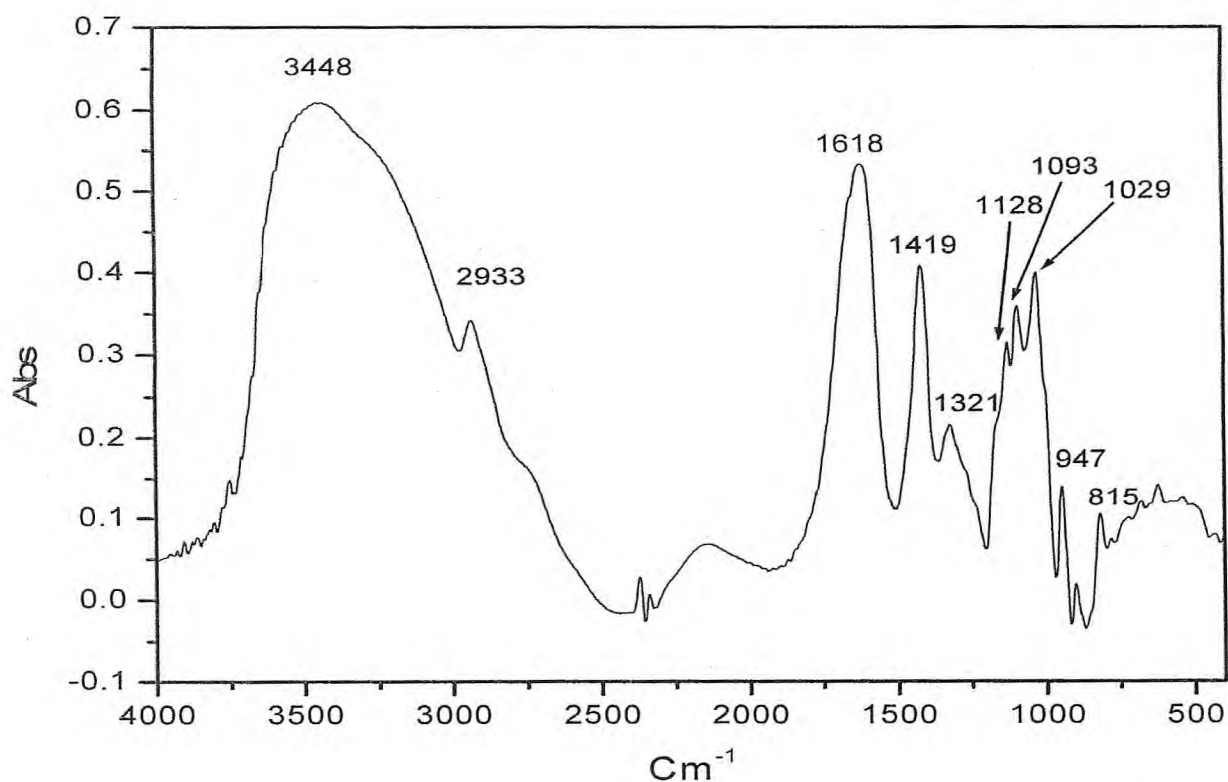


Figura 16 – Espectro na região de infravermelho do alginato +V de *Sargassum vulgare* em pastilhas de KBr.

Tabela 13 – Atribuição das principais bandas no espectro na região do infravermelho dos alginatos.

Número de Onda (cm^{-1})	Atribuição
3451	$\nu\text{O} - \text{H}$
2938	$\nu\text{C} - \text{H}$
1608-1611	νCOO^-
1413-1414	νCOO^-
1317	$\nu\text{C} - \text{O}$
1124-1126	$\nu\text{C} - \text{C}$
1100	Unidades manurônicas
1025	Unidades gulurônicas
948	Ligação (1 \rightarrow 4)
903	$\alpha\text{-L-gulopirranurônico}$
898-884	Deformação de CH (resíduos de β -manurônico).
818-822	Ácido manupiranurônico (pequenas quantidades), rico em homopoligulurônico
814	Rico gulupiranurônico

Fonte: Chandía *et. al.*, 2001; Sartori *et. al.*, 1997; Pereira *et. al.*, 2003.

4.9. Determinação da proporção de resíduos M/G por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H .

As figuras 17 e 18 mostram os espectros de RMN de ^1H para os alginatos -V e +V. Ambos espectros mostraram características de próton anomérico (H-1) e H-5 do ácido gulurônico (4,9 e 4,5 ppm respectivamente) e próton anomérico do ácido manurônico (4,7ppm). A intensidade dos prótons anoméricos foi usada para determinar a proporção M/G. O alginato -V mostrou uma proporção mais alta de M/G (1,38) do que o alginato +V (1,04). A proporção M/G obtida de *S. vulgare* da costa nordestina do Brasil (Ceará) foi mais alta se comparada com a de *Sargassum sp* de Cuba (0,4) (Llanes *et al.*, 1997). Essa proporção de M/G de *Sargassum sp* de Cuba foi determinada por RMN de ^1H após uma pré-hidrólise com 0,5 M de H_2SO_4 a 100°C por 1h. Aumentando o tempo de hidrólise para 4 h a razão M/G aumentou para 0,6. A baixa proporção pode ser devida a essas condições de hidrólise. Quando o alginato +V foi submetido a uma pré-hidrólise o valor da proporção de M/G aumentou de 1,04 para 1,99 e o alginato -V aumentou essa razão de 1,38 para 1,50. A adição de ácidos à solução de alginato leva à precipitação (Moet, 1995). A faixa onde esta precipitação ocorre é dependente da massa da molécula bem como da composição do alginato (Haug *et al.*, 1966). Os alginatos que possuem maior quantidade de blocos de homopolímeros precipitam em pH mais elevado do que alginatos com blocos alternados de MG. Por exemplo, em pH = 2,4, alginatos de espécies de *Laminaria* com estrutura homogênea geralmente precipitam enquanto que alginatos com estrutura desordenada como de *A. nodosum*, permanecem em solução (Haug *et al.*, 1966). Como valores de pH muito baixos foram usados na pré-hidrólise de *Sargassum sp* de Cuba e muito da amostra foi precipitada, acredita-se que esse fato seja o responsável pelo baixo valor obtido da razão M/G. O valor de M/G de *Sargassum fluitans* (1,18) é uma média daquele obtido para duas amostras de alginato de *S. vulgare* (Fourest & Volesky, 1997).

Para estimar a seqüência estrutural de *S. vulgare*, as amostras de alginatos após pré-hidrólise foram investigadas por ^1H -RMN (Fig 17 e 18). Os picos no espectro são determinados de acordo com o previsto nos trabalhos (Penmam & Sanderson, 1972; Johson *et al.*, 1997).

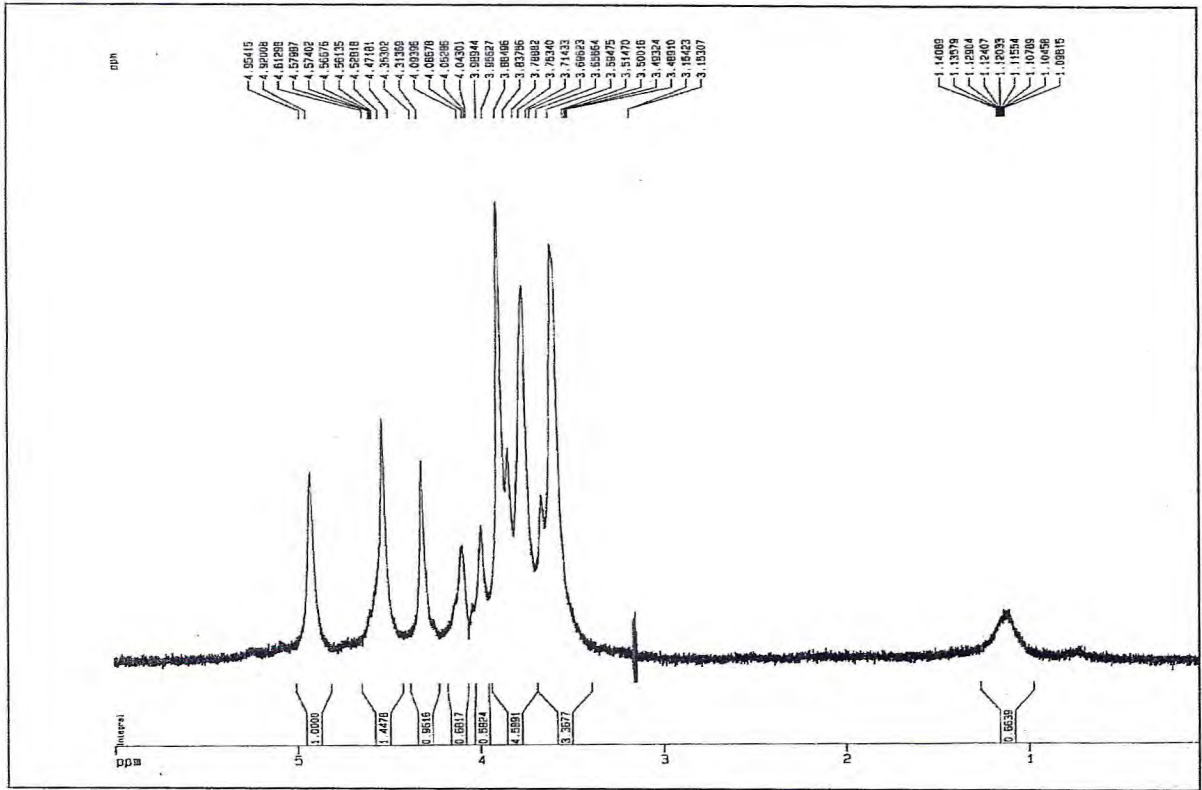


Figura 17 - Espectro de ^1H RMN em D_2O para o alginato +V hidrolisado.

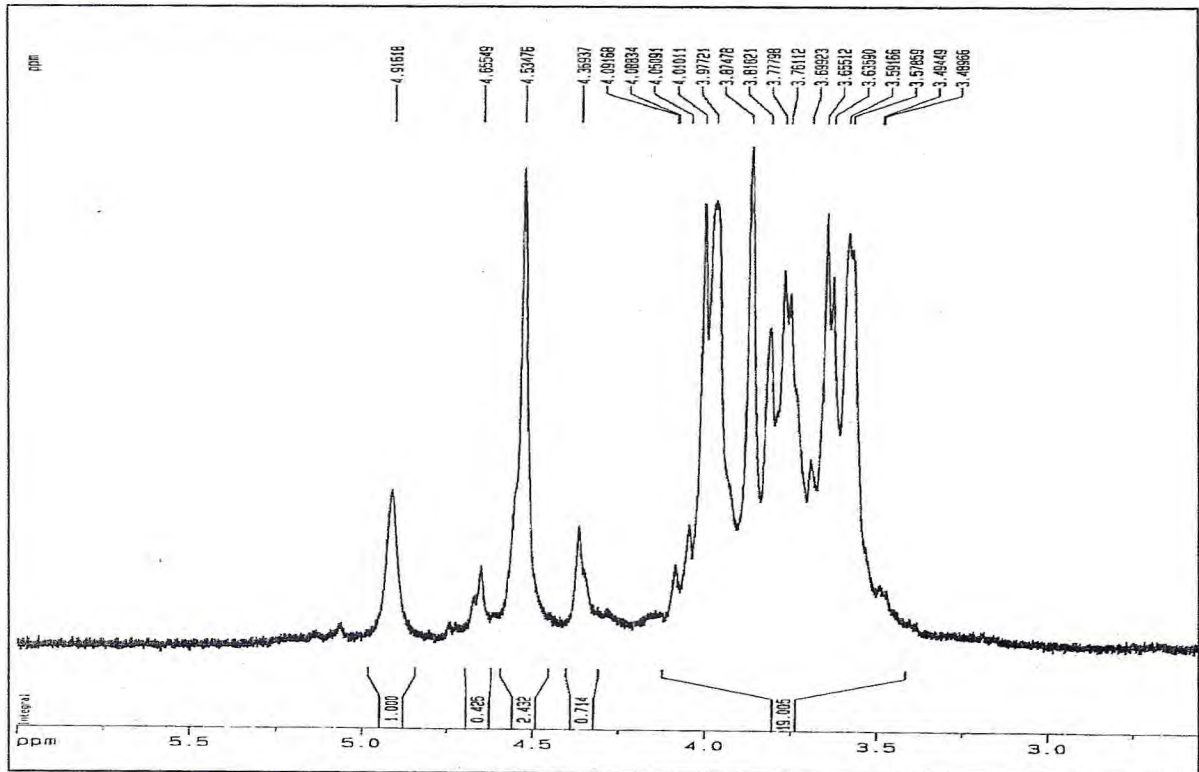


Figura 18 - Espectro de ^1H RMN em D_2O para o alginato -V hidrolisado.

O alginato +V apresentou frações de $F_{GGG} = 0,214$; $F_{MM+MG} = 0,667$; $F_{GGM} + F_{MGM} = 0,118$. Essa estrutura em bloco é característica de alginatos com alto teor de ácido manurônico.

Panikkar & Brasch (1996), sugerem uma classificação de 3 tipos de alginatos baseada na composição de monômeros, nomeada de : alginatos com “alto teor de blocos M” (onde, F_M é maior ou igual a 0,7); alginatos com “alto teor de blocos G” (F_M menor ou igual a 0,6) e alginatos intermediários, com blocos MG (F_M entre 0,6 e 0,7).

O alginato +V de *S. vulgare* pode ser classificado como um alginato do tipo intermediário (0,67). Alginatos de diferentes fontes são comparados quanto as suas composições em monômeros e quanto a razão M/G na Tabela 14.

A variação na composição de M e G é atribuída ao meio ambiente. Vegetais que crescem em águas turbulentas e tendem a ser fisiologicamente mais flexíveis possuem alto conteúdo de resíduos M. Por outro lado, algas muito rígidas mostram um alginato com alto conteúdo de G (Panikkar & Brasch, 1996).

O alginato -V apresentou frações de $F_{MM} = 0,6$ e $F_{GGG} = 0,4$, não foram observadas as frações GGM e MGM nas mesmas condições do alginato +V hidrolisado. A estrutura em bloco característica deste alginato é de alto teor de ácido manurônico, contradizendo a classificação de Panikkar & Brasch, 1996, esse classifica esse alginato (0,6) como sendo do tipo com alto teor de blocos G.

Tabela 14 - Valores de F_M , F_G e a razão de M/G de alginatos de diferentes fontes.

Fontes	F_M	F_G	M/G	Referências
<i>C. retroflexa</i>	0,52	0,48	1,08	Panikkar <i>et. al.</i> , 1997.
<i>D. antarctica</i>	0,80	0,20	4,00	Panikkar <i>et. al.</i> , 1997
<i>D. willana</i>	0,72	0,28	2,57	Panikkar <i>et. al.</i> , 1997
<i>D. potatorum</i>	0,76	0,24	3,17	Panikkar <i>et. al.</i> , 1997
<i>H. banksii</i>	0,60	0,40	1,50	Panikkar <i>et. al.</i> , 1997
<i>M. pyrifera</i>	0,63	0,37	1,70	Panikkar <i>et. al.</i> , 1997
<i>M. boryana</i>	0,44	0,56	0,79	Panikkar <i>et. al.</i> , 1997
<i>S. vulgare</i> • +V	--	--	1,04 (não hidrolisado)	Este trabalho
	0,67	0,33	1,99 (hidrolisado)	Este trabalho
<i>S. vulgare</i> • - V	--	--	1,38 (não hidrolisado)	Este trabalho
	0,60	0,40	1,50 (hidrolisado)	Este trabalho

4.10. Determinação da Massa Molecular por Cromatografia de Permeação em Gel.

As cromatografias de permeação em gel dos alginatos purificados de *Sargassum vulgare* estão mostradas na Figura 19. O alginato -V apresentou um pico único com um volume de eluição de 17,5 mL, enquanto o alginato +V, o volume de eluição do pico único foi de 17,2 mL. Para estimar a massa molar dos picos, utilizou-se como curva padrão de calibração frações de pululan. A equação obtida para esta calibração foi de $M_w = 12,88988 - 0,86905V_e$, onde V_e é o volume de eluição em mL. Baseada nesta equação os valores de M_{pk} dos picos dos alginatos -V e +V foram de $19,3 \times 10^4$ g/mol e $24,8 \times 10^4$ g/mol respectivamente. Esses valores são superiores aos obtidos por viscosimetria e pode ser devido a agregação do material.

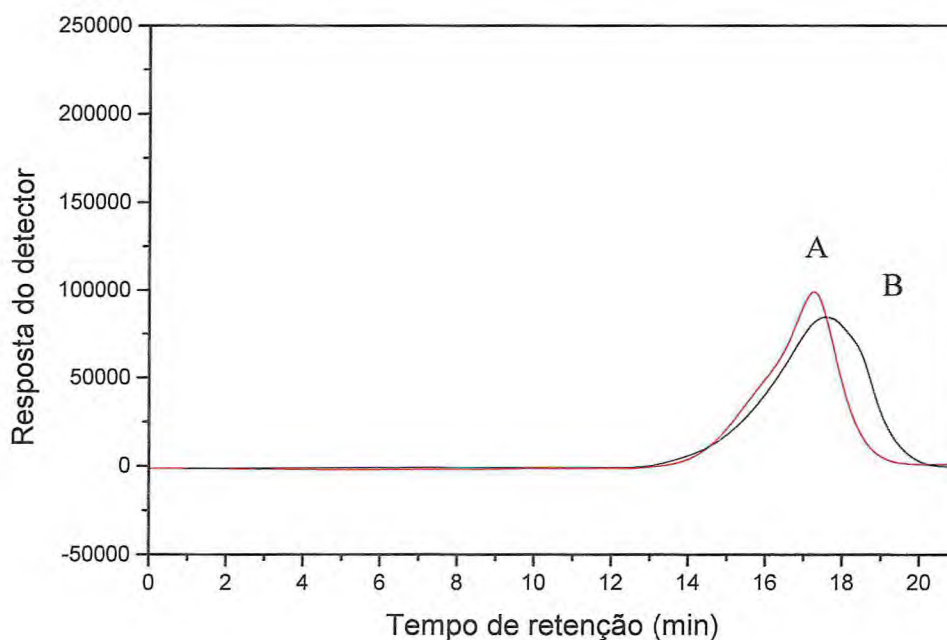


Figura 19 - Cromatografia de GPC dos alginatos purificados de *Sargassum vulgare*. Em A) alginato +V e em B) alginato -V.

4.11. Geleificação

Como pode ser observado na Figura 20 o alginato -V só começou a formar gel a partir de 5 % de concentração (peso / volume) em temperatura de 10°C. Em concentrações menores que essas não foi observada geleificação, como o foi por Melo *et. al.* (2002), utilizando o polissacarídeo da alga vermelha *Gracilaria cornea*.

As temperaturas de transição gel-sol para o alginato +V (Figura 21) a concentração de 10% é mais ou menos 3 vezes maior que a observada para a mostra -V, caracterizando zonas de junções mais fortes no polissacarídeo de maior viscosidade.

Resultados de geleificação dos dois alginatos mostraram um comportamento diferente quando comparados com exsudatos da planta *Enterolobium contortisilliquum* analisados por Oliveira *et. al.* (2001). No polissacarídeo dessa planta, a temperatura de transição gel-sol é bem mais elevada do que a observada para o alginato -V a 10%, e com o +V as concentrações acima de 10% aproxima-se das temperaturas de geleificação da goma extraída da *Enterolobium contortisilliquum*

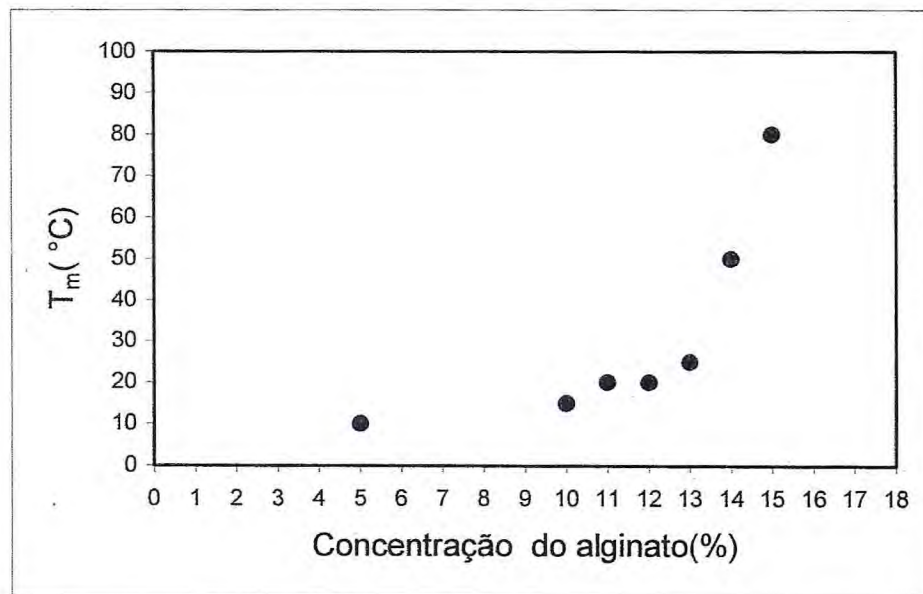


Figura 20 - Geleificação do alginato - V de *Sargassum vulgare* em diferentes concentrações da amostra *versus* temperatura.

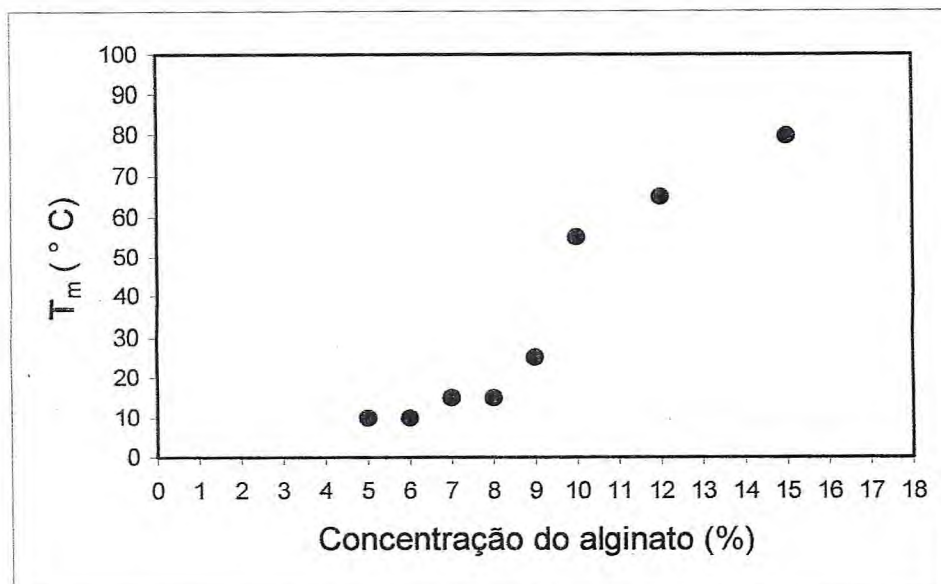


Figura 21 - Geleificação do alginato +V de *Sargassum vulgare* em diferentes concentrações da amostra *versus* temperatura.

4.12. Resposta imunológica humoral de camundongos “swiss” imunizados com a ovalbumina por via subcutânea, associada ou não com os alginatos purificados de *Sargassum vulgare* -V e +V e Al(OH)₃.

A Figura 22 mostra que com 7 dias após o início da imunização, os camundongos não apresentaram resposta significativamente diferente entre o controle, o Al(OH)₃, e os alginatos -V e +V. Aos 14 dias da resposta primária, os três adjuvantes (-V, +V e Al(OH)₃) potencializaram em cerca de 100 e 150% o valor de síntese de anticorpos específicos quando comparados com a ovalbumina, enquanto que não houve diferença significativa entre os três adjuvantes. Aos 21 dias não houve diferença significativa entre os efeitos dos dois alginatos e o efeito do adjuvante do Al(OH)₃, mas os três adjuvantes responderam para a síntese de anticorpos específicos com cerca de 56% em relação ao controle (ovalbumina). Na resposta secundária (28 e 35 dias) e terciária (42 dias) não houve diferença significativa entre os adjuvantes e a ovalbumina, não sendo observado dessa maneira ação do adjuvante dos dois alginatos e do Al(OH)₃. O alginatos -V

associado a ovalbumina apresentou um título de anticorpos maior que o $\text{Al}(\text{OH})_3$ na resposta secundária. Mesmo não utilizando microesferas, esses resultados apresentados assemelham-se aos obtidos por Bowesock *et. al.*, 1996 que utilizando ovalbumina encapsulada em microesferas de alginato em camundongos pela via subcutânea, mostraram que essas esferas potencializavam uma resposta imune maior que a de outros adjuvantes (adjuvante completo de Freund's e $\text{Al}(\text{OH})_3$). Igualmente Kreuter *et. al.*, (1986, 1988), relataram que imunizações pela via subcutânea de camundongos com BSA adsorvido em partículas de poliestireno, potencializavam a resposta imune em maior quantidade que as de outros adjuvantes, como o $\text{Al}(\text{OH})_3$.

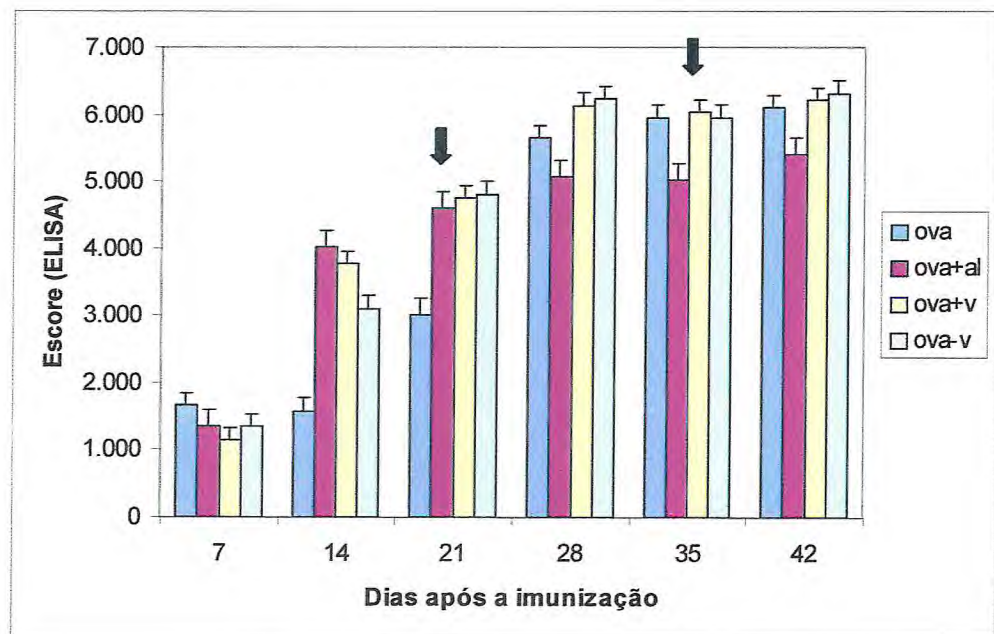


Figura 22 - Cinética da síntese de IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de ovalbumina associada aos alginatos -V e +V de *Sargassum vulgare* e ao $\text{Al}(\text{OH})_3$. As setas representam os reforços administrados.

- 4.13. Resposta imunológica humoral de camundongos "swiss" imunizados com ovalbumina por via oral associada ou não aos alginatos purificados -V e +V de *Sargassum vulgare* e com os alginatos purificados -V e +V de *Sargassum vulgare* sem a ovalbumina .

Os alginatos são habitualmente utilizados como microesferas para aprisionar medicamentos e/ou antígenos, administrados sobre tudo pela via oral (Tze & Tai, 1982). No presente trabalho, a Figura 23 mostra os dados referentes ao uso dos alginatos solúveis contendo como antígeno a ovalbumina.

Aos 5 dias de imunização, os alginatos -V e +V associados a ovalbumina, induziram um aumento de síntese de anticorpos específicos de cerca de 21 e 17% respectivamente e estatisticamente significativa quando comparada com a ovalbumina isolada (Figura 23). Os alginatos -V e +V administrados sem a ovalbumina mostraram uma resposta igual entre si e às vezes menor que o controle (salina) durante toda a cinética de síntese de anticorpos. Aos 10 dias de imunização a resposta específica a ovalbumina associada aos dois alginatos -V e +V, cai ligeiramente para 16% e 13% respectivamente, e essas diferenças são estatisticamente significativas. Aos 15 dias essas diferenças entre o efeito dos alginatos contendo a ovalbumina e a ovalbumina isolada continuam a cair (9% o -V e 8% o +V), mas a diferença é estatisticamente significativa. A partir do trigésimo dia de imunização não observamos mais diferenças entre a ovalbumina e os dois alginatos com ela associada, isto é, não houve efeito imunoadjuvante.

O fato dos alginatos -V e +V sem a presença da ovalbumina manterem uma síntese de anticorpos igual ou menor que o controle durante toda a imunização, sugere que eles não sejam imunogênicos.

Pesquisadores como, O' Hagan *et al.* (1989), testaram partículas de 0,1 e 3 µm de poli(butil-cianoacrilato) adsorvida com ovalbumina em imunizações orais em ratos e observaram que as partículas induziram o aparecimento de anticorpos IgA e contrariamente a ovalbumina solúvel que não induziu anticorpos específicos. Aparentemente, no caso de -V e +V, tem havido potencialização da resposta imune por ação desses adjuvantes até o 15º dia.

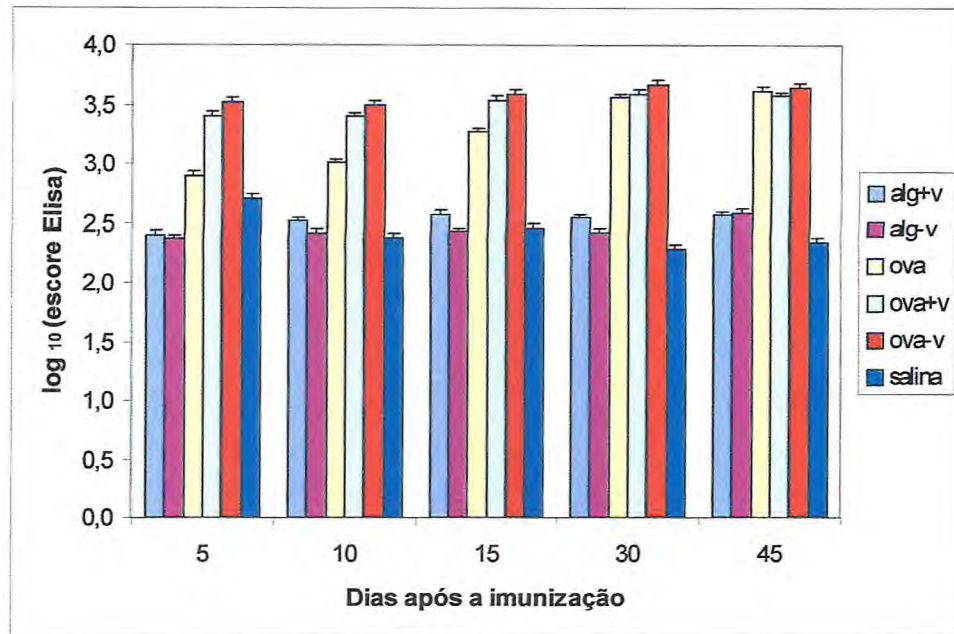


Figura 23 - Cinética da síntese de IgG em camundongos imunizados por via oral com 100 µg de ovalbumina associada ou não aos alginatos -V e +V de *Sargassum vulgare* e aos alginatos -V e +V sem ovalbumina.

Bowersock *et. al.* (1996), mostraram através de experimentos, que as microesferas de alginatos são efetivas para administração oral de vacinas e posteriormente Bowersock *et. al.* (1999), demonstraram que microesferas de alginatos com BSA (albumina do soro bovino) administrados em camundongos pelas vias oral, nasal e subcutânea induziam síntese de anticorpos específicos, mas que a via oral apresentou resposta mais elevada que as vias nasal e subcutânea. Suckow *et. al.* (1996), imunizaram oralmente coelhos com PTE (*Pasteurella multocida*) adsorvidas em microesferas de alginato e observaram que uma imunidade protetora para *P. multocida* foi desenvolvida.

Como podemos observar, vários pesquisadores demonstraram como a utilização de alginatos, na forma de esferas, com diversos antígenos encapsulados, são efetivos. No presente trabalho utilizamos a proteína (ovalbumina) ligada a

alginatos solúveis, e observamos que os alginatos induziram uma resposta precoce com 5 dias em relação à ovalbumina e que perdurou até o 15º dia (Figura 23).

4.14. Resposta imunológica humoral de camundongos “swiss” imunizados com ovalbumina por via nasal, associada ou não aos alginatos purificados –V e +V.

A imunização de camundongos por via nasal com ovalbumina associada ou não aos alginatos não provocou aumento da resposta ao longo dos dias (Figura 24). Os alginatos não agiram como adjuvantes durante a observação ao longo de 45 dias, o que foi diferente do obtido por Bowersock *et al.* (1999), porém estes utilizaram o antígeno aprisionado em micropesferas.

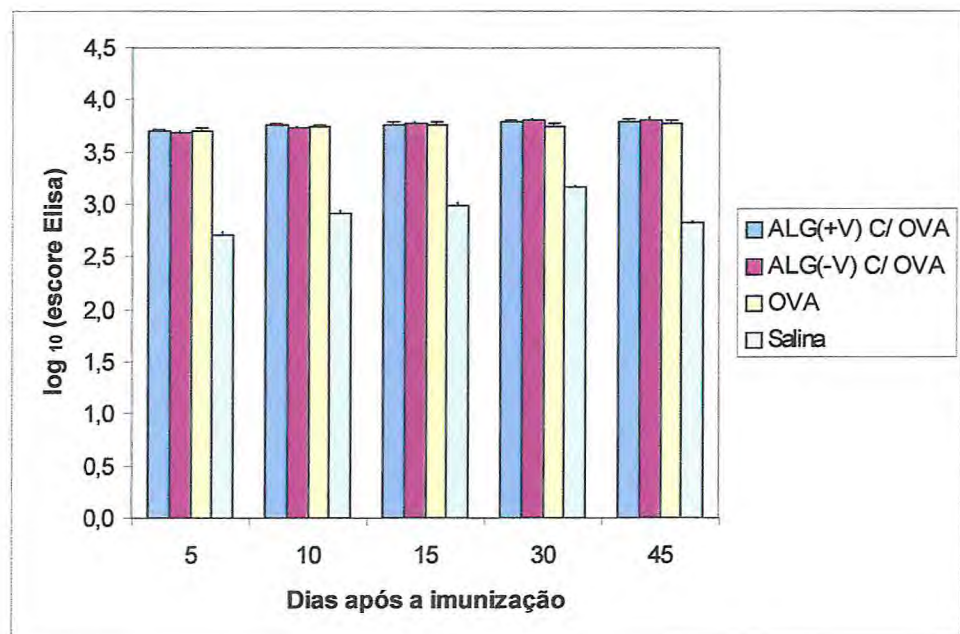


Figura 24 - Cinética da síntese de IgG em camundongos imunizados por via nasal com 10 µg de ovalbumina associada ou não aos alginatos –V e +V de *Sargassum vulgare*

Igualmente os resultados de Rebelatto *et. al.* (2001) demonstraram que imunizações em gado também com microesferas de alginato encapsulando PSA (albumina do soro de porco), apresentavam potencialização da resposta imune de acordo com as vias de imunizações. A via nasal, induziu uma resposta humoral mucosal e sistêmica, enquanto que pela via oral não houve indução da resposta humoral.

Os resultados encontrados nesse estudo para via nasal (Figura 25), podem ter como explicação o fato do alginatos terem sido utilizados na forma solúvel e devido a isso, não houve um efetivo de aprisionamento da proteína. Fato que não deve ocorrer nas microesferas.

- 4.15. Resposta imunológica humoral de camundongos "swiss" imunizados com ovalbumina por via oral associada ou não aos alginatos purificados -V e +V gelificados e com os alginatos purificados -V e +V gelificados sem a ovalbumina.

A Figura 25 mostra que a ovalbumina administrada por via oral induziu uma síntese de anticorpos maior que quando associada aos alginatos -V e +V nos 5 e 10 dias iniciais da imunização, chegando a igualar-se com eles aos 15 dias, mas a partir do trigésimo dia a ovalbumina com os alginatos induziram um pequeno aumento da resposta imune (cerca de 6 e 4%), que aumentou para (7,6 e 6,7%, respectivamente) até os 45 dias. Da mesma forma que na imunização oral (alginatos sem gelificação e sem ovalbumina), os alginatos gelificados sem a adição da ovalbumina apresentaram um comportamento semelhante, com valores iguais ou menores que a salina. Desta maneira, os alginatos -V e +V não apresentam imunogenicidade qualquer que seja a forma de administração (gelificada ou solúvel).

A utilização de alginatos -V e +V geleificados, associados a ovalbumina, induziram uma inversão na cinética de anticorpos quando comparados com os alginatos -V e +V solúveis associados a ovalbumina na imunização oral (ítem 4.14). Assim, as respostas da imunização oral com os alginatos solúveis, foram precoces para os dois alginatos, enquanto que para as imunizações orais com os alginatos gelificados, as respostas imunes foram mais tardias e só começaram a ultrapassar a resposta da proteína de referência (ovalbumina), a partir de 30 dias. Isso sugere,

que a forma de utilização do alginato, microesfera, solúvel ou gel tenha forte influência sobre o tipo de resposta, e esta vai variar de acordo com as características dos adjuvantes.

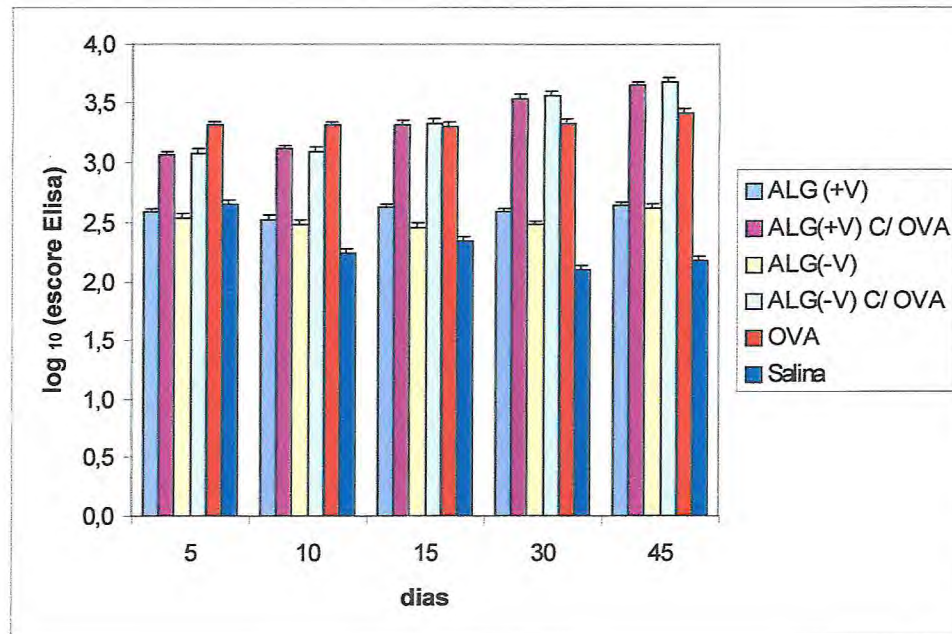


Figura 25 - Cinética da síntese de IgG em camundongos imunizados por via oral com 100 µg de ovalbumina associada ou não aos alginatos –V e +V de *Sargassum vulgare* gelificados e aos alginatos –V e +V gelificados sem ovalbumina.

4.16. Avaliação da Resposta IgE específica por PCA

A cinética da síntese de IgE induzida por imunização de camundongos com 100 µg de ovalbumina por via subcutânea foi avaliada por PCA em ratos e detectou síntese de IgE anti-ovalbumina somente a partir do vigésimo oitavo dia (7 dias após o reforço), enquanto que na presença dos alginatos –V e +V ao longo dos dias que se seguiram a imunização houve um aumento da síntese de IgE até o 35º dia, respectivamente (14 dias após o reforço). Na presença do alginato –V, não houve síntese de IgE específico na resposta primária, aparecendo síntese somente a partir 28º dia, mas aos 35 dias essa resposta foi 60% maior que a da ovalbumina sozinha e aos 42 dias essa resposta cai para níveis mais baixos do que a da própria ovalbumina. Houve síntese de IgE na resposta primária da ovalbumina associada

ao alginato +V. A resposta ocorreu desde o 14^o dia, e aos 28 dias essa resposta foi 150% maior que de ovalbumina, enquanto que aos 35 dias foi igual aquela induzida pelo alginato -V caindo em seguida para o nível da ovalbumina (Figura 26).

O efeito do alginato +V foi superior ao alginato -V durante as respostas primária e secundária à ovalbumina. Em caso de serem utilizados como imunoadjuvantes nos procedimentos de vacinação, os alginatos da alga parda *S. vulgare* (-V e +V) deve-se levar em consideração o fato de esses alginatos terem induzido uma resposta precoce de síntese de IgE específica, embora não duradoura quando comparada à resposta induzida pela ovalbumina isolada. A síntese de IgE poderia provocar sintomas alérgicos desfavoráveis ao processo de imunização (Van Halteren *et. al.*, 1997; Sudo *et. al.*, 1997).

Os soros dos camundongos imunizados com a ovalbumina associada ou não aos alginatos -V e +V por via oral, foram avaliados quanto à síntese de IgE, mas não foram detectados títulos de anticorpos específicos. Para os camundongos imunizados com a ovalbumina associada ou não aos alginatos -V e +V gelificados por via oral, também não foi detectada síntese de anticorpos do tipo IgE, mas foram detectados anticorpos IgE para os animais imunizados com a ovalbumina associada ou não aos alginatos -V e +V através da via nasal (Figura 27).

Na Figura 27 podemos observar que os alginatos -V e +V contendo a ovalbumina induziram uma redução na resposta imune quando comparados com a imunização de animais com a referida proteína na ausência dos alginatos. Nesse caso, os alginatos não tiveram efeito potencializador significativo da resposta imune.

4.17. Atividade Tóxica

Os alginatos -V e +V utilizados na concentração de 2, 5% (massa/ volume) não apresentaram toxicidade em camundongos quando injetados por via intraperitoneal, por um período de 24 horas. Esse resultado é bastante satisfatório, pois como essa concentração chega a ser 2,5 vezes maior que as empregadas nos testes de imunização nas três vias, para ser avaliada a adjuvanticidade dos alginatos, a resposta das sínteses de anticorpos não está relacionada à toxicidade dos mesmos.

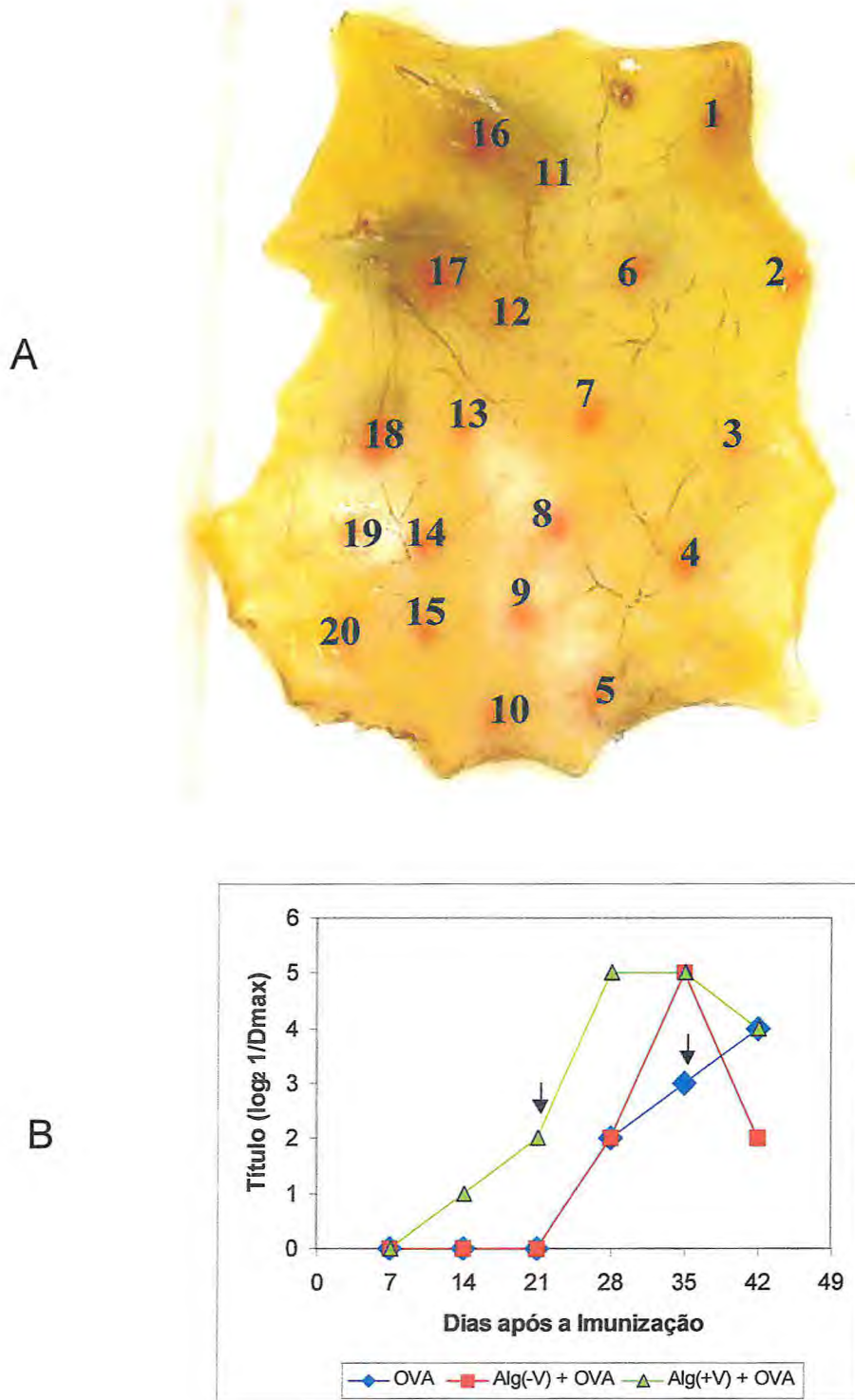
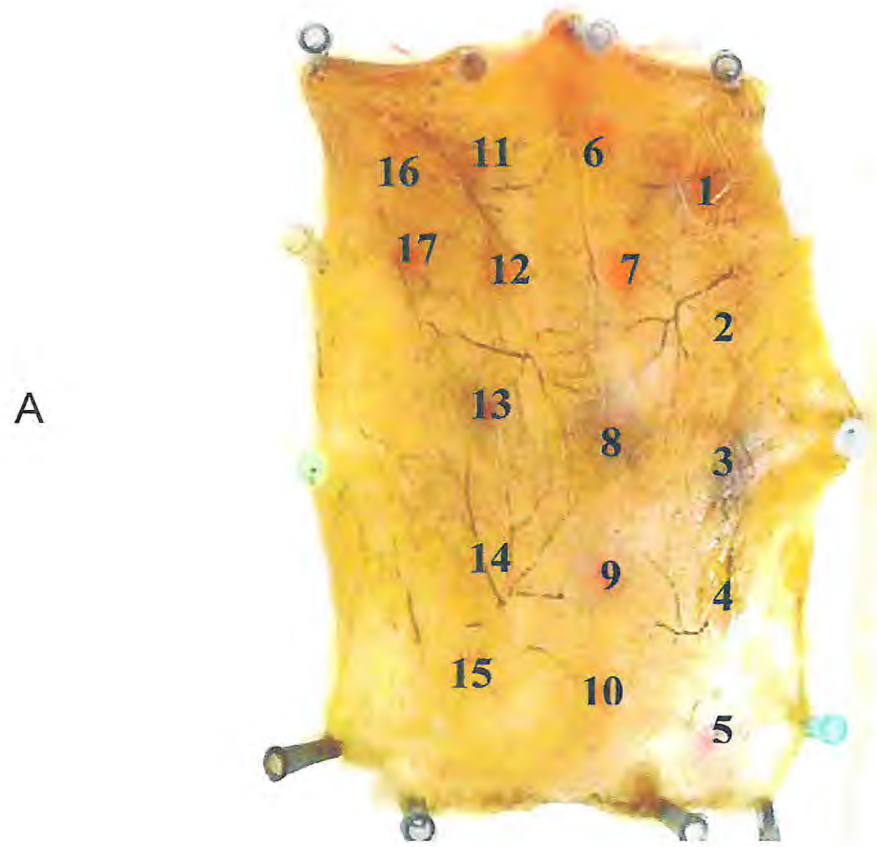


Figura 26 - A) Resposta imunológica do tipo IgE, detectado por PCA em soros de camundongos imunizados por via subcutânea. B) Representação gráfica da resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de ovalbumina, 100 µg de ovalbumina + alginato -V e com 100 µg de ovalbumina + alginato +V.



B

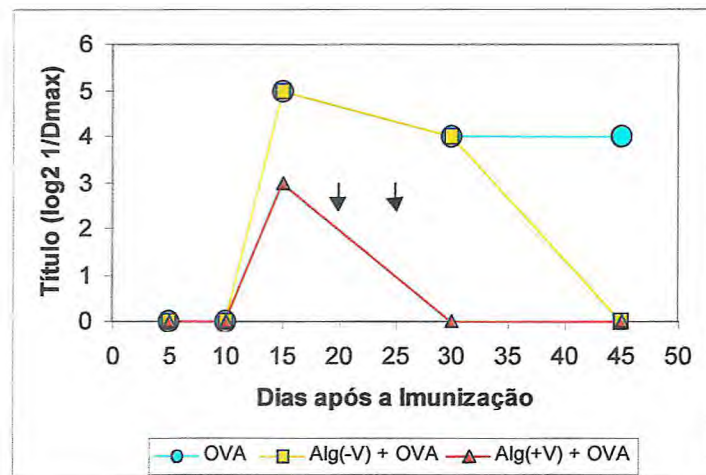


Figura 27 - A) Resposta imunológica do tipo IgE, detectado por PCA em soros de camundongos imunizados por via nasal. B) Representação gráfica da resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via nasal com

100 µg de ovalbumina, 100 µg de ovalbumina + alginato -V e com 100 µg de ovalbumina + alginato +V.

4.18. Avaliação do efeito dos alginatos -V e +V em bolsa de ar subcutânea sobre a migração de neutrófilos e macrófagos.

Os efeitos da aplicação dos alginatos -V e +V sobre a migração de neutrófilos nos tempos de 4, 8, 16, 24, 48, e 72 horas podem ser observados na Figura 28. Os dois alginatos (-V e +V) não estimularam a migração de neutrófilos nos tempos de 4 e 8 horas. A partir de 16 horas houve um estímulo significativamente diferente por parte dos alginatos entre si e com relação ao padrão de referência (Biogel). Com 24 horas os alginatos diferiram significativamente do Biogel, mas não houve diferença entre eles. Com 48 horas o estímulo dos alginatos em relação aos neutrófilos foi reduzido e diferiram significativamente do controle, havendo diferença entre eles. Com 72 horas os alginatos apresentam diferença significativa do Biogel. O pico máximo de migração dos neutrófilos para os dois alginatos foi de 24 horas, enquanto que para o controle foi entre 16 e 24 horas.

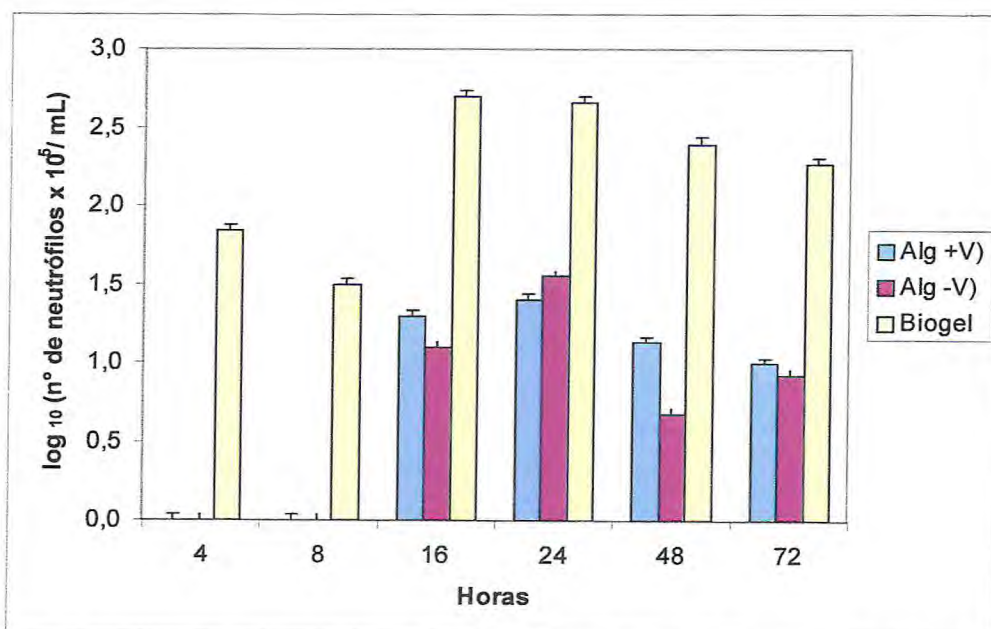


Figura 28 - Efeito dos alginatos -V e +V em bolsa de ar subcutânea sobre a migração de neutrófilos. Os valores estão expressos como média e \pm erro padrão (n= 10).

Na Figura 29 observamos a migração de macrófagos nos tempos de 4, 8, 16, 24, 48 e 72 horas. Os alginatos (+V e -V) estimularam muito pouco a migração dos macrófagos com 4 e 8 horas, enquanto que com 16 horas eles estimularam de maneira igual entre si mas com diferença bastante significativa do padrão. Com 24 horas o alginato -V apresentou o seu pico máximo de estímulo aos macrófagos, enquanto que o pico máximo de estímulo aos macrófagos para o alginato +V foi com 48 horas.

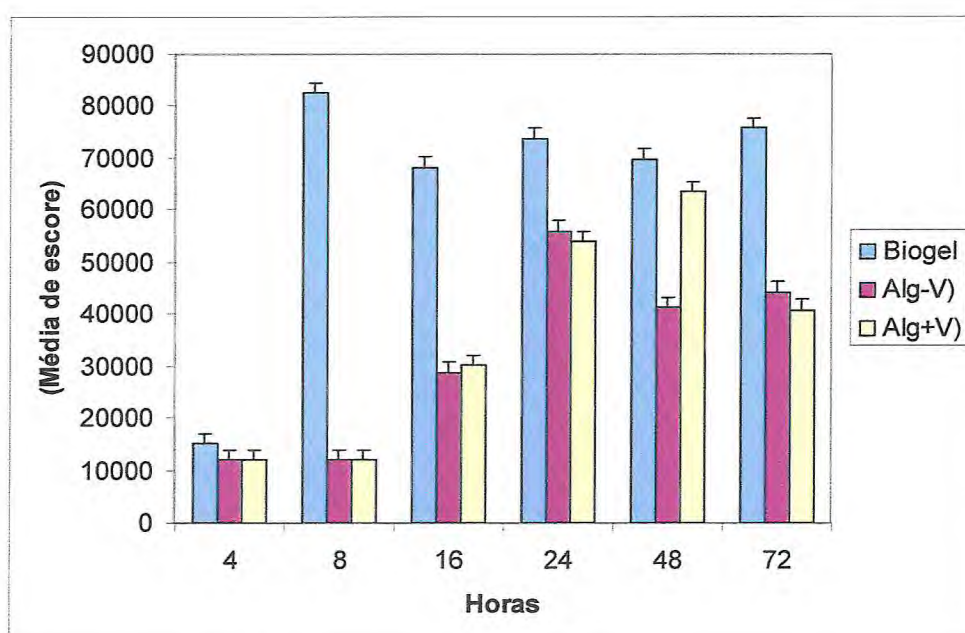


Figura 29 - Efeito dos alginatos -V e +V em bolsa de ar subcutânea sobre a migração de macrófagos. Os valores estão expressos como média e \pm erro padrão (n= 10).

Segundo Zimmermann *et. al.* (1992) alginatos comerciais (brutos), são potentes estimuladores de macrófagos e linfócitos. Por essa razão, reações inflamatórias, crescimento de tecido fibroso são resultados de esferas de alginatos brutos com células de Langerhans encapsuladas. Enquanto que esferas de alginato de bário purificadas implantadas intraperitonealmente em ratos ou camundongos por três semanas não mostraram crescimento de tecido fibroso.

Fujihara & Nagumo (1993), demonstraram que o alginato de *Sargassum fulvellum* tem a capacidade de aumentar a atividade citostática de macrófagos e que sua alta atividade antitumoral deve estar associada com essa ativação de macrófagos. Já Otterlei *et al.* (1991), encontraram que alginatos estimulavam os monócitos a produzirem interleucina-1, interleucina-6 e TNF α . Otterlei *et al.*, 1991, demonstraram que alginatos de blocos MM e MG estimulam a produção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF, mas blocos GG não estimulam. Fujihara & Nagumo (1993), também demonstraram que os alginatos com alto conteúdo de blocos MM, estimulava mais os macrófagos do que alginatos com blocos GG. Observações semelhantes foram encontradas por Son *et al.*, 2001, que demonstraram que um alginato rico em blocos MM estimulava várias funções dos macrófagos peritoneais, como as atividades antitumorais, fagocíticas e produção de TNF α , óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Os alginatos em estudo apresentaram diferenças nas suas composições. O alginato +V tem uma composição intermediária (blocos MG), enquanto que o alginato -V possui uma composição de bloco MM. Mesmo assim, eles induziram recrutamento de macrófagos semelhante, comportamento esse perfeitamente justificado por Otterlei *et al.*, 1991.

4.19. Avaliação do efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos e macrófagos.

A avaliação dos efeitos dos alginatos na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos e macrófagos nos tempos de 4 e 24 horas estão mostradas nas figuras 30 e 31 respectivamente. Os alginatos +V e -V estimularam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal nos tempos de 4 e 24 horas de maneira semelhante à indometacina associada aos alginatos, sendo diferente significativamente da indometacina e com o passar do tempo (24 h) todos os tratamentos diminuíram o estímulo de neutrófilos. Esses resultados comprovam que alginatos não apresentaram efeito inflamatório no modelo de cavidade peritoneal.

Com relação aos macrófagos, no tempo de 4 horas, o alginato -V induziu uma migração significativamente menor que a do alginato +V assim como os padrões (indo e salina). Com 24 horas o alginato -V aumentou significativamente a

migração de macrófagos em relação tanto à indo quanto à salina, enquanto que o alginato +V, também com 4 horas, apresentou uma migração menor que os padrões, mas era bastante aumentada em relação ao alginato -V.

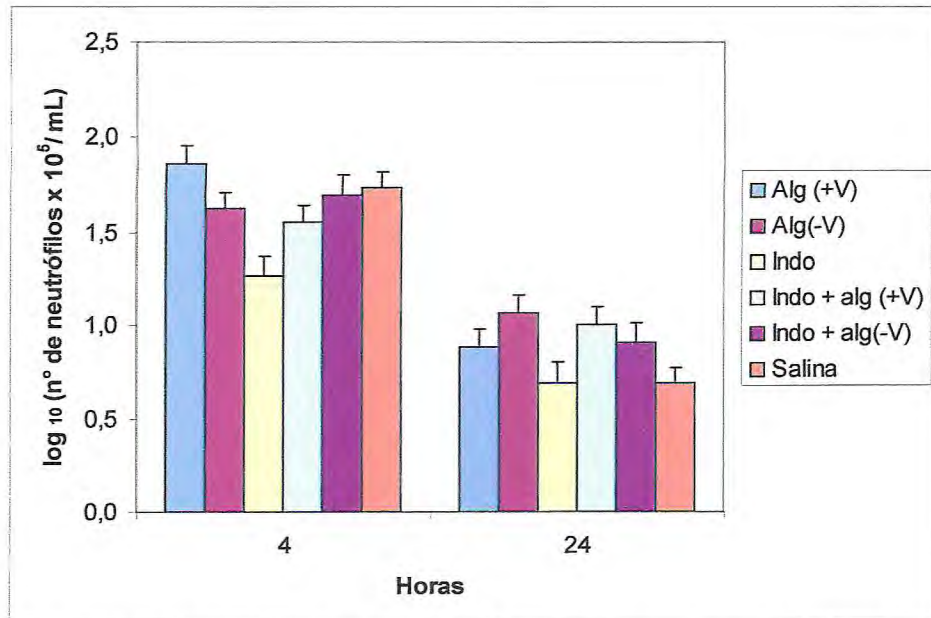


Figura 30 - Efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre a migração de neutrófilos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (n=10).

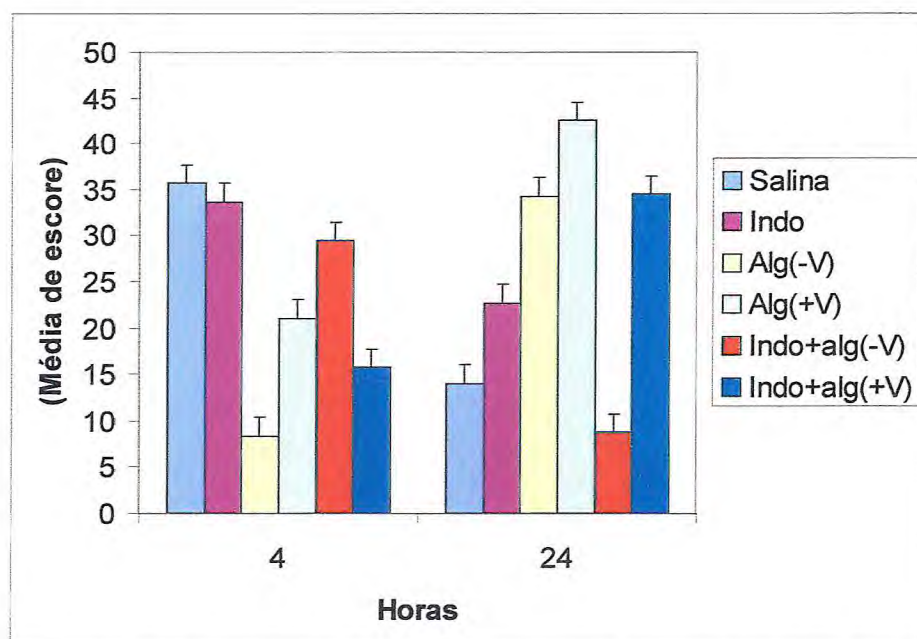


Figura 31 - Efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre a migração de macrófagos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (n=10)

Com 24 horas, o alginato +V apresentou uma resposta mais elevada do que todos os tratamentos. Esses resultados podem indicar que as diferenças de viscosidade entre os alginatos podem interferir na migração de macrófagos.

Avaliação do efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre o influxo de proteínas.

Os alginatos -V e +V induziram aumento no teor de proteínas com 4 horas em relação ao controle, salina. Com 24 horas, o alginato -V reduziu o teor de proteína mantendo-se semelhante a indo, associação do alginato -V com indo e ao controle. No entanto o alginato +V, com 24 horas, não induziu alterações significativas no teor de proteínas em relação a 4 horas, e a associação com indo não foi capaz de modificá-lo (Figura 32). Esses resultados mostram que os alginatos têm comportamentos diferentes.

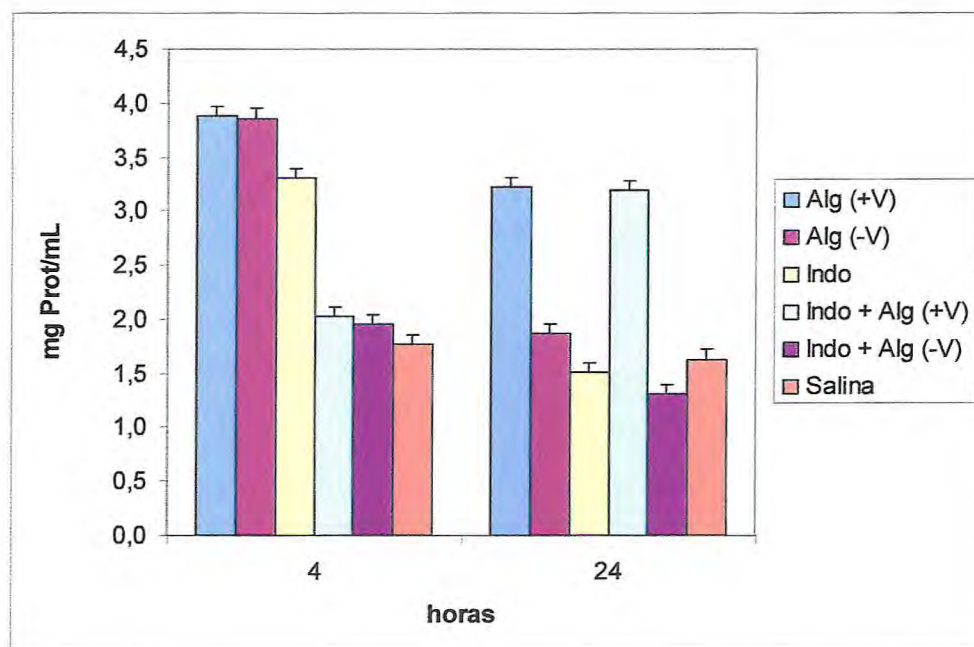


Figura 32 - Efeito dos alginatos -V e +V na cavidade peritoneal sobre o influxo de proteínas totais. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (n=10)

Com o aumento da permeabilidade vascular, ocorrem exsudações de proteínas plasmáticas para o local da injúria (Contran *et. al.*, 1999), assim o teor de proteínas totais constitui uma forma indireta de avaliar a permeabilidade vascular.

4.20. Avaliação do efeito dos alginatos -V e +V sobre a permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos.

A avaliação dos efeitos dos alginatos sobre a permeabilidade vascular induzida por ácido acético está mostrada na Figura 33. O alginato +V aumentou significativamente a permeabilidade vascular em relação ao alginato -V e ao controle, salina. Enquanto que o alginato -V não provocou alterações, comportou-se semelhante ao controle. A indo associada aos alginatos inibiu significativamente o mecanismo de ação dos mesmos sobre a permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético.

A indometacina é uma droga usada como referência neste modelo experimental e seu mecanismo de ação antiinflamatório está associado a ciclooxigenase. (Contran *et. al.*, 1999).

Os resultados do alginato +V sobre o teor de proteína para a cavidade peritoneal corroboram com os seus efeitos sobre a permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético, mostrando mais uma vez que eles apresentam comportamentos diferentes. Pode-se deduzir que a viscosidade e a composição dos alginatos devem ser considerados em provocar tais diferenças entre eles.

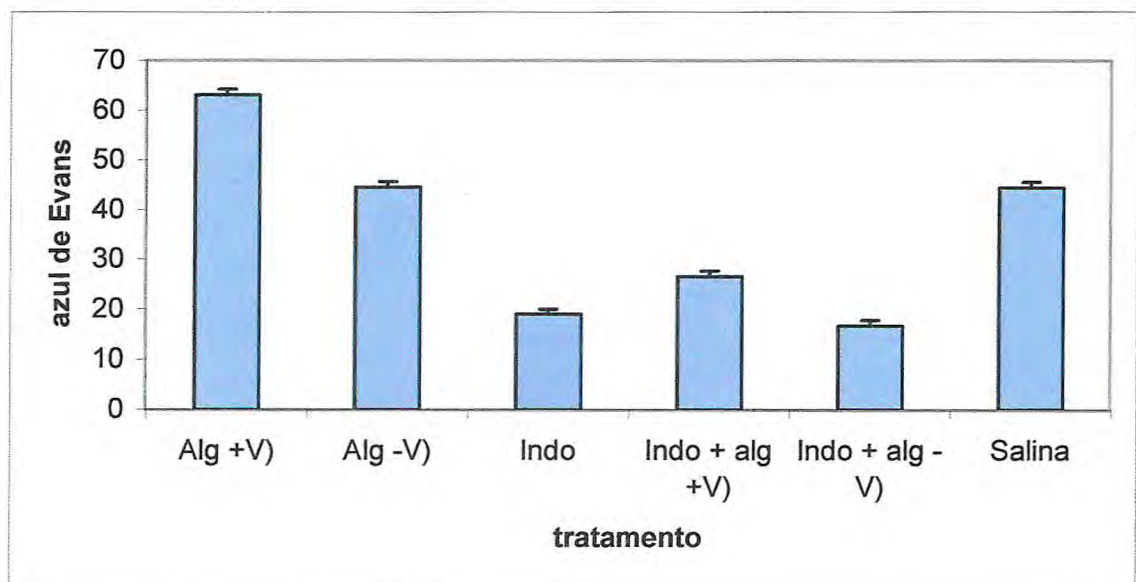


Figura 33 - Efeito dos alginatos -V e +V sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão (n=10).

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, os alginatos -V e +V associados a proteína (ovalbumina), potencializaram a síntese de anticorpos totais, tanto pela via subcutânea como pela via oral, embora pela via subcutânea eles tenham potencializado a síntese de anticorpos específicos IgE. Concomitantemente, pela via oral não houve síntese de anticorpos específicos IgE por parte dos alginatos associados a proteína, sugerindo, assim, que a via de administração desses alginatos, que gera efeito adjuvante seja a oral. Além disso, os alginatos -V e +V exerceram efeito pró-inflamatório, recrutando neutrófilos e macrófagos, tanto pelo método de bolsa de ar subcutânea, quanto por cavidade peritoneal, embora em níveis reduzidos em relação aos controles. Provocaram aumento do teor de proteínas, mas somente o alginato +V foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular. Apesar da necessidade de experimentos adicionais, diante de todas essas características encontradas para os dois alginatos, sugere-se que eles possam vir a ser utilizados como adjuvantes mucosos para expressarem antígenos em vacinação animal e/ou humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. (2000). **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª Ed. Elsevier Editora Ltda, 553.p
- ALLISON, A. C. & BYARS, N. E. (1990). Adjuvants for a new generation of vaccines. In: *New Generation Vaccines* (Eds Woodrow. G. C. and Levine, M. M.). Marcel Dekker, New York, p 129-140.
- ANG Jr., O. P. (1984) Preliminary study on the alginate contents of *Sargassum* spp. in Balibago, Calatagan, Philippines. **Hydrobiologia**, **116/117**, p 547-550.
- ATSUKI, K. & TOMODA, Y. (1926). Studies on seaweeds of japanl. The chemical constituents of Laminaria, **J. Soc. Chem. Ind. Japan**. **29**, 509-517.
- AUDIBERT, F. M. & LISE, L. D. (1993). Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. **Immunol. Today**, **14**, p 281-284.
- BENNETT, S.; Por SB, STANLEY, E.R.; BREIT, S.N. (1992). Monocyte proliferation in a cytokine-free, serum-free system. **J Immunol Methods** **153**: 201-212.
- BENOIT, M.-A.; BARAS, B.; GILLARD, J. (1999) Preparation and characterization of protein-loaded poly(ϵ -caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, **184**, p 73-84.
- BHARDWAJ, T.R.; KANWAR, M.; LAL, R.; GUPTA, A.(2000). Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. **Drug Dev Ind Pharm** **26(10)**: p 1025-38.
- BIRD, G. M.; & HAAS, O. (1931). On the nature of the cell wall constituents of *Laminaria Spp.* Mannuronic acid.**J. Biochem.** **25**: 26-30.
- BOWERSOCK, L. T.; HOGENESCH, H.; SUCKOW, M.; GUIMOND, P.; MARTIN, S.; BORIE, D.; TORREGROSA, S.; PARK, H.; PARK, K. (1999). Oral vaccination of animals with antigens encapsulated in alginate microspheres. **Vaccine**, **17**, p 1804-1811.
- BOWERSOCK, L. T.; HOGENESCH, H.; SUCKOW, M.; PORTER, E. R.; JACKSON, R.; PARK, H.; PARK, K. (1996). Oral vaccination with alginate microsphere systems. **Journal of Controlled Release**, **39**, p 209-220

- BOYD, J., AND J. R. TURVEY. (1978). Structural studies of alginic acid using a bacterial poly- α -L-gulonate lyase. **Carbohydr. Res.** **66**:187-194.
- BRADFORD, M.M. (1976), Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.** **72**: 248-254
- BRITO, A. C. F. DE, (2000). Composição e Efeito de Íons nas Propriedades Físico-Químicas da Goma Exsudada da *Sterculia striata* (Chichá), **Master Thesis**. Fortaleza, 81 p.
- BUTCHER, E. C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) to specificity and diversity. **Cell**, **676**: 1033-1037.
- CALUMPONG, P. H.; MAYPA, P. A.; MAGBANUA, M. (1999) Population and alginate yield and quality assessment of four *Sargassum* species in Negros Island, central Philippines. **Hydrobiologia**, **398/399**, p 211-215.
- CHANDÍA, P. N.; MATSUHIRO, B.; VÁSQUEZ, E. A. (2001) Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, **46**, p 81-87.
- CHURMS, C., STEPHEN, A., & STEYM, CH. (1986). Analytical comparison of gums from *Acacia hebeclada* and other Gummiferae species. **Phytochemistry**, **25**, 2807-2809.
- CLEMENTI, F.; MANCINI, M.; MORESI, M. (1998). Rheology of alginates from *Azotobacter vinelandii* in aqueous dispersions. **J Food Eng** **36**:51- 62.
- CONTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, P. (1999). **Robbins Pathologic Basics of Disease**. 6ª edit., Saunders company, New York, Cap III, 46-83p.
- COOPER, P. D. (1994). The selective induction of different immune responses by vaccine adjuvants. In: **Strategies in Vaccine Design** (Ed. Ada, g. L.). R. G. Landes Company, Austin, p 125-158.
- COUTELIER, J. P., VAN DER LOGT, J. T. M., HEESSEN, F.W.A., WARNIER, G., VAN SNICK, J. (1987). IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. **Journal of Experimental Medicine**. **165** (64).
- COX, C. J. & COULTER, R. A. (1996) Adjuvants- a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, **Vol. 15**, number 3, p 248-256.

- DALE, M. M., FOREMAN, J. C. (1988). Introduction to immunology and pathology of host defence mechanisms. In: DALE, M. M., FOREMAN, J. C. (eds). **Textbook of immunopharmacology**. Blackwell Scientific Publications, p 401-411.
- DAVIS, W. F. (1950) Algin from *Sargassum*. **SCIENCE**, Vol. 111, number 2876, p 150.
- DIETRICH, P. C.; FARIAS, M. G. G.; de ABREU, D. R. L.; LEITE, L. E.; da SILVA, F. L.; NADER, B. H. (1995) A new approach for the characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, 108, p 143-153.
- DRAGET, I. K.; SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. (2002) **Biopolymers, polysaccharides II: polysaccharides from Eukaryotes, Vol. 6**.
- EDELMAN, R. (1980). Vaccine Adjuvants. **Review of Infection Diseases**, v. 2, p. 370-383.
- EDWARDS, J. C. W., SEDGWICK A. D & WILLOUGHBY D. A. (1981). The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air. An in vivo tissue culture system. **Journal of Pathology**, 134: 147-156.
- ELDRIDGE, J. H., HAMMOND, C. J. AND MEULBROEK, J. A.. (1990). Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. **J. Control. Release** 11:205-214.
- ELDRIDGE J.H., STAAS J. .K., MEULBROEK J. A., TICE T.R., GILLEY, R. M. (1991). Biodegradable and biocompatible poly (DL-Lactide-Co-Glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. **Infect Immun**; 59:2978-83.
- ELDRIDGE, J. H. (1989). Vaccine containing biodegradable microspheres specifically enter the gut-associated lymphoid tissue following oral administration and induce a disseminated mucosal immune response. **Adv. Exp. Med. Biol.** 251, 191-202.
- ELDRIDGE, J.H, STAAS, J.K.; MEULBROEK, J.A.; TIC, T.R.; GILLEY, R.M. (1991). Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. **Mol Immunol**;28:287-90.

- ELIAS, H-G. (1997). **An introduction to polymer science**. Weinheim, Germany: VCH, 201.
- ERTESVAG, H. and VALL, S. (1998) Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, **59**, p 85-91.
- FISCHER, F. G. & DORFEL, H. (1955). Die Polyuronsauren der Braunalgen (Kohlenhydrate der Algen). **Z. Physiol. Chem.** **302**: 186-203.
- FOUREST, E. and VOLESKY, B. (1997) Alginate properties and heavy metal biosorption by marine algae. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol. **67/1**.
- FUJIHARA, M. & NAGUMO, T. (1993). An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. **Carbohydrate Research**, **243**, p 211-216.
- GANDER, B.; THOMASIN, C.; MERKLE, H.P.; MEN, Y. & CORRADIN, G. (1993). Pulsed tetanus toxoid release from PLGA-microspheres and its relevance for immunogenicity in mice. In: **Proceedings of the International Symposium of Controlled Release Bioactive Materials**. Washington DC, **20**: 65-66.
- GOMBOTZ, R. W.; WEE, F. S. (1998) Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **31**, p 267-285.
- GRASDALEN, H.; LARSEN, B.; SMIDSROD, O. (1977) ¹³C-N.M.R. studies of alginate. **Elsevier**, p 1-5.
- GRASDALEN, H.; LARSEN, B.; SMIDSROD, O. (1981) ¹³C-N.M.R. Studies of monomeric composition and sequence in alginate. **Carbohydrate Research**, **89**, p 179-191.
- GUPTA, K. R. AND SIBER, R. G. (1995) Adjuvant for human vaccines- current status, problems and future prospects. **Vaccine**, Vol. **13**, number **14**, p 1263-1276.
- GUPTA, R. K. & SIBER, G. R. (1994). Comparison of adjuvant activities of aluminum phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. **Biologicals**, **22**, p 53-63.

- GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINE, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C. K. (1993). Adjuvants- a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, **11**, p 293-306.
- GURGEL FILHO, E.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M.; SILVA JR, J. B. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA FILHO, F. ,(2003). Chemical and X-ray analyses of five dental gutta-percha cone brands. **International Endodontic Journal**, , v. **36**, p. 1-6.
- HAUG, A. (1964). Composition and properties of alginates. Norw. Inst. Seaweed Res. Rep. No. 30. Department of Biotechnology, Trondheim: 95–98.
- HAUG, A.; LARSEN, B. AND SMIDSROD, O. (1966). A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. **Acta Chem.Scand.**, **20**:183-90.
- HERNÁNDEZ-CARMONA, G.; McHUGH, J. D.; ARVIZU-HIGUERA, L. D.; RODRÍGUEZ-MONTESINOS, E. Y. (1999) Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. 1. Effect of pre-extraction treatments on yield and quality of alginate. **Journal of Applied Phycology**, **10**, p 507-513.
- HERNÁNDEZ-CARMONA, G.; McHUGH, J. D.; LÓPEZ-GUTIÉRREZ, F. (1999) Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. 2. Studies on extraction conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. **Journal of Applied Phycology**, **11**, p 493-502.
- HILLERY, M. A. (1998). Microparticulate delivery systems: potential drug/vaccine carriers via mucosal routes. PSTT, Vol. 1, nº 2.
- HIST, E. I.; JONES, K. N.; JONES, W. O. (1939). The structure of alginic acid. Part I. **J. Chem. Soc.** 1880-1885.
- IMHOF, B. A. & DUNON, D. (1995). Leukocyte migration and adhesion. **Advances in Immunology**, **58**: 348-416.
- JAMEELA S.R., LATHA P.G., SUBRAMONIAM A., JAYAKRISHNAN A. (1996). Antitumour activity of itoxantrone-loaded chitosan microspheres against Ehrlich ascites carcinoma. **J. Pharm. Pharmacol.** v.48, p.685-8
- JENNINGS, V. M. (1995) Review of selected adjuvants used in antibody production. **ILAR Journal**, **37(3)**, p 119-125.

- JOHNSON, A. F.; CRAIG, M. Q. D.; MERCER, D. A. (1997) Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates. **J. Pharm. Pharmacol**, **49**, p 639-643.
- JOLY, A. B. (1967). **Flora Marinha do Litoral Norte do Estado de São Paulo e Regiões Circunvizinhas**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Boletim nº 294, São Paulo-SP, 393p.
- KENNEDY, J.F. & WHITE, C..A. (1983). Bioactive Carbohydrates in **Chemistry, Biochemistry and Biology**. Ellis Horwood, Chichester
- KIMURA, Y.; WATANABE, K.; OKUDA, H. (1996). Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. **J. Ethnopharmacology**, **54**, p 47-54.
- KLÖCK, G.; FRANK, H.; HOUBEN, R.; ZEKORN, T.; HORCHER, A.; SIEBERS, U.; WÖHRLE, M.; FEDERLIN, K.; ZIMMERMANN, U. (1994) Production of purified alginates suitable for use in immunisolated transplantation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **40**, p 638-643.
- KLÖCK, G.; PFEFFERMANN, A.; RYSER, C.; GRÖHN, P.; KUTTLER, B.; HAHN, H.-J.; ZIMMERMANN, U. (1997) Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. **Biomaterials**, **18**, p 707-713.
- KREUTER, J. (1988). Possibilities of using nanoparticles as carriers for drugs and vaccines. **J Microencaps** **5**:115-127.
- KREUTER, J.; BERG, U., LIEHL, E.; SOLIVA, M. ; SPEISER, P.P. (1986). Influence of the particle size on the adjuvant effect of particulate polymeric adjuvants. **Vaccine** **4(2)**: 125-129.
- KSHIRSAGAR, A. N. (2000). Drug delivery systems. **Indian Journal of Pharmacology**, **32**, S54-S61.
- LLANES, F.; SAURIOL, F.; MORIN, G. F. AND PERLIN, S. A. (1997) An examination of sodium alginate from *Sargassum* by NMR spectroscopy. **Can. J. Chem**, **75**, p 585-590.

- MACIEL, J.; ROCHA, S.; PAULA, R. C. M. Caracterização de géis da goma exsudada de *Spondias cytherea* In. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E ENGENHARIA DE MATERIAIS, 2002, Natal Anais do Congresso Brasileiro de Ciências e Engenharia de Materiais, 2002.
- MACKIE, W. ; NOY, R. ; SELLEN, D. B.. (1980). Solution properties of sodium alginate, **Biopolymer**, **19**, 1839-1860.
- MALOY, K.J.; DONACHIE, A.M.; O'HAGAN, D. and MOWAT, A.M. (1994). Induction of mucosal and systemic immune responses by immunization with ovalbumin entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. **Immunology**. **81**: 661-667.
- MANCINI, M.; MORESI, M.; AND SAPPINO, F. (1996) Rheological behaviour of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, **28**, p 283-295.
- MANDEL, K. G.; DAGGY, B. P.; BRODIE, D. A.; JACOBY, H. I. (2000). Review article: alginate-raft formulations in the treatment of heartburn and acid reflux. **Aliment Pharmacol Ther.**, **14**, p 669-690.
- MANTELL, C.L. (1947) *The Water-Soluble Gums*. 279 pp. New York: Reinhold Publishing Corp.
- MARCOTTE, M.; TAHERIAN, A. R.; RAMASWAMY, H. S. (2001). Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, v. **34**, n. 8, p. 695-703.
- MARTIN, S.; DANIEL, S. L.; ROUSE, B. T. (1991). Cytokines and regulation of cellular immune responses to viruses. In: **Topic in Vaccine Adjuvant Research** (Eds Spriggs, D. R. and KOFF, W. C.). CRC Press, Boca Raton, FL, p 39-50.
- MARTINSEN A, SKJØ AK-BRÆK G, SMIDSRØD O. (1989). Alginate as immobilization material. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads..**Biotechnol. Bioeng.** **33**:79-89.
- MARTINSEN, A.; SKJAK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. (1991) Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. **Carbohydrates Polymers**, **15**, p 171-193.

- MELO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; PAULA, R. C. M. (2002) Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, . **49**, n. **4**, p. 491-498.
- MIAWA, T. (1930). Alginic acid. **J. Chem. Soc. Japan**, **51**: 738-745.
- MICHALEK, M. S.; ELDRIDGE, H. J.; CURTISS III, R.; ROSENTHAL, L. K. (1994). Antigen Delivery Systems: New Approaches to Mucosal Immunization. **Handbook of Mucosal Immunology**.
- MOE, S. T., DRAGET, K. I., SKJÅK-BRÆK, G. and SMIDSRØD, O. (1995) Alginates. In A. M. Stephen (ed.), *Food Polysaccharides*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 245-286.
- MOTA, I. & WONG, D. (1969). 'Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization.' **Life Sci.**, **8**, 813.
- MUTWIRI, G.; BOWERSOCK, T.; KIDANE, A.; SANCHEZ, M.; GERDTS, V.; BABIUK, A. L.; GRIEBEL, P. (2002). Induction of mucosal immune responses following enteric immunization with antigen delivered in alginate microspheres. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 6626, p 1-8.
- NARAYANI, R.; RAO, K. P. (1995). Polymer-coated gelatin capsules as oral delivery devices and their gastrointestinal tract behaviour in humans. **J. Biomat. Sci. Polymer Edition**, **7**, p 39-48.
- NEEFJES, J. J.; SCHUMACHER, T. N. M.; PLOEGH, H. L. (1991). Assembly and intracellular transport of major histocompatibility complex molecules. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, **3**, p 601-609.
- NELSON, W. L. & CRETCHER, L. H. (1929). The alginic acid from *Macrocystis pyrifera*. **J. Am. Chem. Soc.** **51** 1914.
- NELSON, W. L. & CRETCHER, L. H. (1930). The isolation and identification of d-mannuronic acid lactone from the *Macrocystis pyrifera*. **J. Am. Chem. Soc.** **52**, 2130-2134.
- NELSON, W. L. & CRETCHER, L. H. (1932). The properties of d-mannuronic acid lactone, **J. Am. Chem. Soc.** **54**, 3409-3406.

- NEWMAN, M. J., & POWELL, M. F. (1995). Immunological and formulation design considerations for subunit vaccines. In M. F. Powell & M. J. Newman (Eds.), **Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach** (pp. 1-42). New York: Plenum Press.
- O'HAGAN, D.T., RAHMAN, D., Mcgee, J.P., JEFFERY, H., DAVIES, M.C., WILLIAMS, P., DAVIS, S.S., CHALLACOMBE, S.J. (1991). Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems. **Immunology** **73**: 239-242.
- O'HAGAN, D. T.(1994). Microparticles as oral vaccines. *In* D. T. O'Hagan (ed.), Novel delivery systems for oral vaccines. **CRC Press, Inc.**, Boca Raton, Fla, p. 175-205.
- O'HAGAN, D. T., MCGEE, J. P.; HOLMGREN, J.; MOWAT, A. M.; DONACHE, A. M.; MILLS, K. H. G.; GAISFORD, W.; RAHMAN, D. and CHALLACOMBE, S. J. (1993). Biodegradable microparticles for oral immunization. **Vaccine** **11**:149-154.
- O'HAGAN, D.T.; PALIN, K.J.; . DAVIS, S.S. (1989). Poly (butyl-2-cyanoacrylate) particles as adjuvants for oral immunization .**Vaccine V: 7, Issue 3** , , p 213-216
- OLDING, B. (1991). Cytokine regulation of humoral immune responses. In: **Topic in Vaccine Adjuvant Research** (Eds Spriggs, D. R. and KOFF, W. C.). CRC Press, Boca Raton, FL, p 25-37.
- OLIVEIRA, D. J.; SILVA, A. D.; de PAULA, M. C. R.; FEITOSA, A. P. J; PAULA, B. C. H. (2001). Composition and effect of salt on rheological and gelation properties of *Enterolobium contortisilliquum* gum exudate. **International Journal of Biological Macromolecules**, **29**, p 35-44.
- ORIVE, G.; PONCE, S.; HERNÁNDEZ, R. M.; GASCÓN, A. F.; IGARTUA M.; PEDRAZ, L. J. (2003) Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. **Biomaterials**, ARTICLE IN PRESS.
- OTTERLEI, M., OSTGAARD, K., SKJAK-BRAEK, G., SMIDSROD, O., SOONSHIONG, P. AND ESPEVIK, T. (1991). Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. **Journal of Immunotherapy**, **10**: 286-291.

- OVARY, Z.(1958). Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. **Journal of Immunology**, v.81, p.355-358
- PAINTER, J. T. (1998) Carbohydrates polymers in food preservation: an integrated view of the maillard reaction with special reference to discoveries of preserved foods in Sphagnum-dominated peat bogs. **Carbohydrates Polymers**. 36, p 335-347.
- PANIKKAR, R. AND BRASH, J. D. (1996) Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, 293, p 119-132.
- PANIKKAR, R. AND BRASH, J. D. (1997) Biosynthetic implications of NMR analyses of alginate homo- and heteropolymers from New Zealand brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, 300, p 229-238.
- PAUL, W. E. (1993). The immune system. In: **Fundamental Immunology**, Third Edition (Ed. Paul, w. E.). Raven Press, New York, p 1-20.
- PAULA, R. C. M.; SANTANA, S. A.; RODRIGUES, J. F.(2001) Composition and Rheological propertis of Albizia lebbeck gum exudate. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 2, p. 133-139.
- PAULA,, R. C. . (1995). Characterization of Brazilian Tree Exudate Gums from *Anacardium occidentale* and *Anandenanthera macrocarpa* B. Tese de Doutorado apreentada ao deapartamneto de Química da Universidade da Manchester, 169pp, Oxford Road.
- PEARSON, D. (1973). General methods – basic constituintes. In: **Laboratory techniques in food analysis**. New York: John Wiley & Sons,. cap. 2, p. 27-77.
- PENMAN, A. & SANDERSON, G.R. (1972). A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. **Carbohydr.Res.**, 25:280.
- PEREIRA, L.; SOUSA, A.; COELHO, H.; AMADO, M. A.; RIBEIRO-CLARO, A. J. P. (2003) Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, article in press,p 1-6.

- RAMON, G. (1925). Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. **Bulletin de Societe Centrale de Medicine Veterinaire**. **101**, 227-234.
- RAMON, G. (1926). Procédés pour accroître la production des antitoxines. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. **40**, p. 1-10
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. (1996). **Biology of Plants**. Worth Publishers, 5^a ed. New York, 735p.
- REBELATTO, C. M.; GUIMOND, P.; BOWERSOCK, L. T.; HOGENESCH, H. (2001). Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate microparticles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Vol. **83**, p 93-105.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (1997). **Imunologia**. 4^a edição. São Paulo: Manole.
- ROSA, I. G. (2000). Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L. Caracterização estrutural e aplicação no isolamento de lectinas ligantes de galactose. Tese de Doutorado em Bioquímica Vegetal. Universidade Federal do Ceará.
- ROSSI, A. G., HELLEWELL, P. G. (1994). **Mechanism of Neutrophil accumulation in tissues**. In: HELLEWELL, P. G., WILLIAMS, T. J. (eds). Academic press, London, 223-243.
- RYAN, J. E.; DALY, M. L.; MILLS, G. H. K. (2001) Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. **TRENDS in Biotechnology**, Vol. **19**, number 8.
- SALVEMINI, D., RILEY, D. P., CUZZOCREA, S. (2002). Sod mimetics are coming of age. **Nature Reviews- Drug discovery**, **1**: 367-374.
- SARTORI, C.; FINCH, S. D.; RALPH, B.; GILDING, K. (1997) Determination of the cation content of alginate thin films by FT i.r. spectroscopy. **Polymers**, Vol. **38**, number 1, p 43-51.
- SAYAG, J.; MEAUME, S.; BOHBOT, S. (1996). Healing properties of calcium alginate dressings. **J. Wound Care.**, **5**, p 357-362.
- SCHMIDT, E. & VOCHE, F. (1926). Zur Kenntnis der Polyglykuronsauren, **Chem. Ber.** **59**, 1585-1588.

- SCHWENDEMAN, S. P.; CARDAMONE, M.; BRANDON, M. R.; KLIBANOV, A.; LANGER, R. (1996). Stability of proteins and their delivery from biodegradable polymer microparticles, in: *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*, **Marcel Dekker, New York**, pp. 1-49.
- SKJAK-BRAEK, G.; GRASDALE, H.; SMIDSORD, O. (1989). Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. **Carbohydr. Polym.** **10**: 31-54.
- SON, H. E.; MOON, Y. E.; RHEE, K. D.; PYO, S. (2001). Stimulation of various functions in murine peritoneal macrophages by high mannuronic acid-containing alginate (HMA) exposure *in vivo*. **International Immunopharmacology**, **1**, p 147-154.
- SOUZA, G. E. P., CUNHA, F. Q., MELLO, R., FERREIRA, S. H. (1988). Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents action**, **24**: 377-380.
- SPRIGGS, D. R. & KOFF, W. C. (1991). *Topics in Vaccine Adjuvant Research*. **CRC Press**, Boca Raton, FL.
- STANFORD, E. C. C. (1883b). On algin: a new substance obtained from some of the commoner species of marine algae. **Chem. News** 47:267-269.
- STANFORD, E. C. C. (1883a). On algin: a new substance obtained from some of the commoner species of marine algae. **Chem. News** 47:254-257.
- STEPHEN, A. M. (1995) **Food Polysaccharides and their applications**. Department of Chemistry, University of Cape Town, Rondebosch, South Africa. Mancel Dekker. Ind. New York. USA.
- STEVENS, M.P. (1990) **Polymer chemistry: an introduction**, 2 ed. Oxford Universty Press. Inc. New York.
- SUCKOW, A. M.; BOWERSOCK, L. T.; PARK, H.; PARK, K. (1996). Oral immunization of rabbits against *Pasteurella multocida* with an alginate microsphere delivery system. **J. Biomater. Sci. Poymer End**, Vol. 8, p 131-139.

- SUDO, N.; SAWAMURA, S.; TANAKA, K.; AIBA Y.; KUBO, C.; KOGA, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction, **The Journal of Immunology**, Vol 159 (4) 1739-1745.
- TABATA Y, IKADA Y. (1990): Phagocytosis of polymer microspheres by macrophages. **Adv. Polymer Sci** 94:107-141.
- TAKAHASHI, H.; TAKESHITA, T.; MOREIN, B.; PUTNEY, S.; GERMAIN, R. N.; BERZOFSKY, J. A. (1990). Indroction of CD8+ cytotoxic T-cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. **Nature (London)**, 344, p 873-875.
- TIZARD, R. I. (1998). **Imunologia Veterinária, uma Introdução**. Rocca, 5ª edição, São Paulo, 545p.
- TORRES, M. R. (1998). RNase da Macroalga Marinha *Ulva fasciata Delile*: Purificação Parcial, Propriedades e Efeitos da Alta e da Baixa Salinidade. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 89pp, Fortaleza –Ceará.
- TZE, W. J., & TAI, J. (1982). Preparation of pseudoislets for morphological and functional studies. **Transplantation (Baltimore)**. 34:228-231.
- VAN HALTEREN, A. G.S; VAN DER CAMMEN, M. J.F.; BIEWENGA, J.; SAVELKOUL, H. F.J.; KRAAL, G. (1997) . IgE and mast cell responses on intestinalallergen exposure: A murine model to study the onset of food allergy, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, V 99, Issue 1, Part 1, p 94-99.
- VASCONCELOS, I. M.; TRENTIM, A.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. (1994). Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine Max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Vol. 312, p 357-366.
- WHISTLER, R.L. E BEMILLER, J.N., (1993) gums industriais de eds. *Polysaccharides e seus derivatives*, 3ns Edn., Academic Pressionar, Inc., San Diego.

- WHITTLE, B. A. (1964). The use of changes capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, **22**: 246-253
- WILLIAMS, T. J. (1985). Vascular response and suppression in vasodilatation and oedema. In: BONTA, I. L., BRAY, M. A., PARNHAM, M. J. (eds). Handbook of inflammation, **Elsevier**, **5**: 49-59.
- WISE, D. L., T. D. FELLMAN, J. E. SANDERSON, and R. L. WENTWORTH. (1979). Lactide/glycolide polymers used in as surgical suture material, raw material for osteosynthesis and in sustained release forms of drugs,. *In* G.Gregoriadis (ed.), **Drug carriers in medicine**. Academic Press, London, United Kingdom. p. 237.
- WU, J.-Y.; GARDNER, B. H.; MURPHY, C. I. *et al.* (1992). Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. **J. Immunol.**, **148**, p 1519-1525.
- WYNNE, M. J. & BOLD, H. C. (1986). A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical Western Atlantic. **Canadian Journal of Botany**, **64**: 2239-2281.
- ZIMMERMANN, U.; KLÖCK, G.; FEDERLIN, K.; HANNIG, K.; KOWALSKI, M.; BRETZEL, G. R.; HORCHER, A.; ENTENMANN, H.; SIEBER, U.; ZEKORN, T. (1992). Production of mitogen-contamination free alginates with variable ration of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. **Electrophoresis**, **13**, p 269-274.
- ZVYAGINTSEVA, N. T.; SHEVCHENKO, M. N.; POPIVNICH, B. I.; ISAKOV, V. V.; SCOBUN, S. A.; SUNDUKOVA, V. E.; ELYAKOVA, A. L. (1999) A new procedure for the separation of water-soluble polisaccharides from brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, **322**, p 32-39.