

Desenvolvimento de Aplicações para Polissacarídeos de *Porphyridium* com Actividade Antiviral

nº ADI/2006/M2.3/0032

M Filomena de J Raposo e Rui M. C de Moraes

INTRODUÇÃO

Porphyridium cruentum é uma microalga vermelha (Rhodophyta), marinha. Apresenta-se, por vezes, em colónias de forma irregular, com matrizes mucilaginosas. São grandes produtoras de polissacarídeos sulfatados (Lee asin, 1991), ácidos gordos polinsaturados (Akimoto *et al.*, 1998) e pigmentos (especialmente ficoeritrina B). O polissacarídeo produzido vai sendo acumulado na cápsula que delimita as células e, gradualmente, dissolve-se no meio de cultura, tornando-o muito viscoso. O exopolissacarídeo (EPS) possui propriedades aniónicas devido à existência de ácidos urónicos e grupos ésteres sulfatados, nas posições 6 e 3 da glucose e galactose. Devido às suas propriedades anti-oxidantes, anti-virais e anti-inflamatórias, o EPS poderá ser aplicado na indústria cosmética e farmacêutica.

OBJECTIVOS DO PROJECTO

- Estudos laboratoriais para optimização de parâmetros de cultura e produção dos polissacarídeos
- Produção de *Porphyridium* em grande escala utilizando fotobioreactores
- Processamento da biomassa e separação dos polissacarídeos
- Caracterização físico-química dos polissacarídeos de *Porphyridium*
- Realização de estudos *in vitro* sobre a actividade antiviral dos polissacarídeos
- Formulação galénica para potenciais utilizações como componente de sticks labiais
- Estudos de mercado e da concorrência.

MATERIAIS E MÉTODOS

• *Porphyridium cruentum* -

2 Estirpes: ISR, da Universidade de Ben-Gurion, Israel
ESP, da Universidade de Santiago de Compostela, Espanha

• Obtenção do EPS –

Extracção: centrifugação a 10000rpm, 20min
repouso (4 dias); filtração sob vácuo e precipitação com etanol
colocação do EPS a -20°C; liofilização

Purificação: por diálise com membrana de celulose, contra água desionizada e bidestilada

• Análises reológicas

Viscosidade
Elasticidade

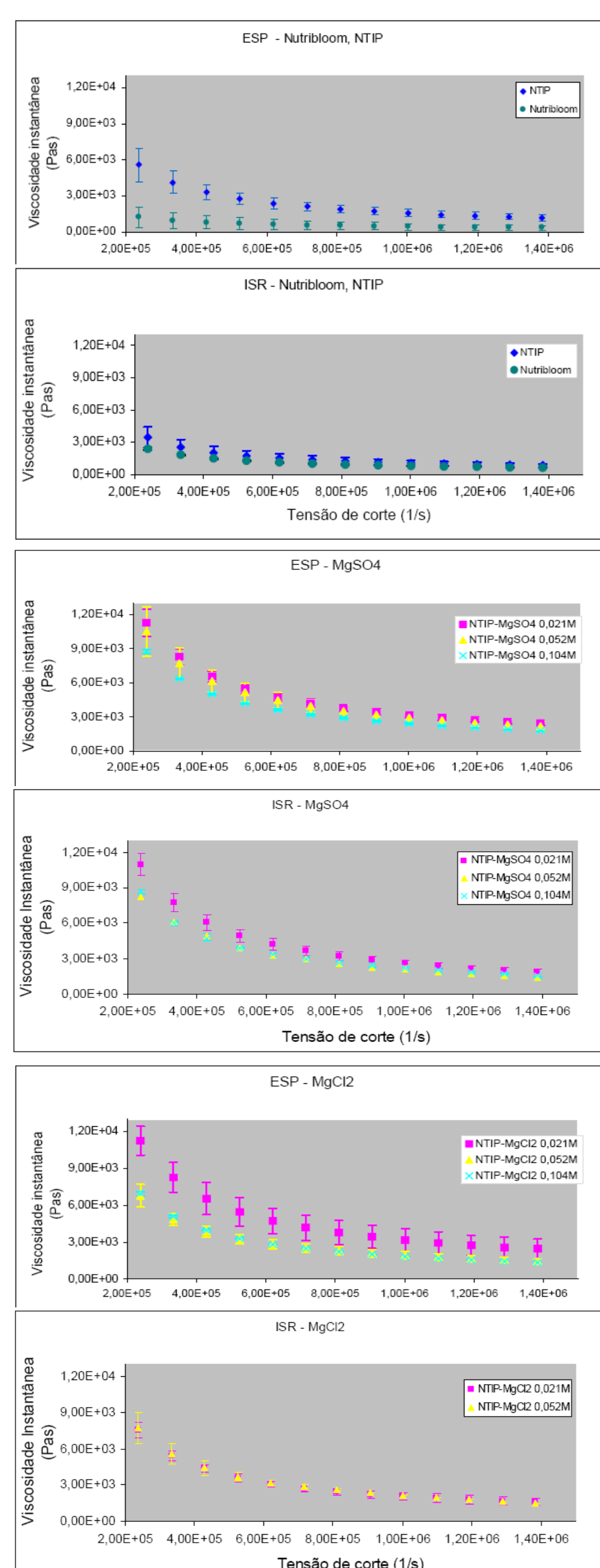


Figura 1. Viscosidade e Tensão de corte do EPS em função da fonte de magnésio e da concentração em sulfatos no meio de cultura, para as duas estirpes.

RESULTADOS

Produção de polissacarídeos de *Porphyridium* à escala industrial

• A melhor produção de EPS, para ambas as estirpes, verificou-se com NTIP+21mM MgSO4

• O aumento da concentração em sulfato de magnésio,

↳ diminui a produção de EPS mas

↳ aumenta a percentagem em sulfatos

↳ não influencia a percentagem em ácidos urónicos e em hidratos de carbono no EPS

↳ diminui a percentagem em proteínas no EPS

↳ (em concentrações elevadas, 104mM) promove uma melhor acção terapêutica no EPS.

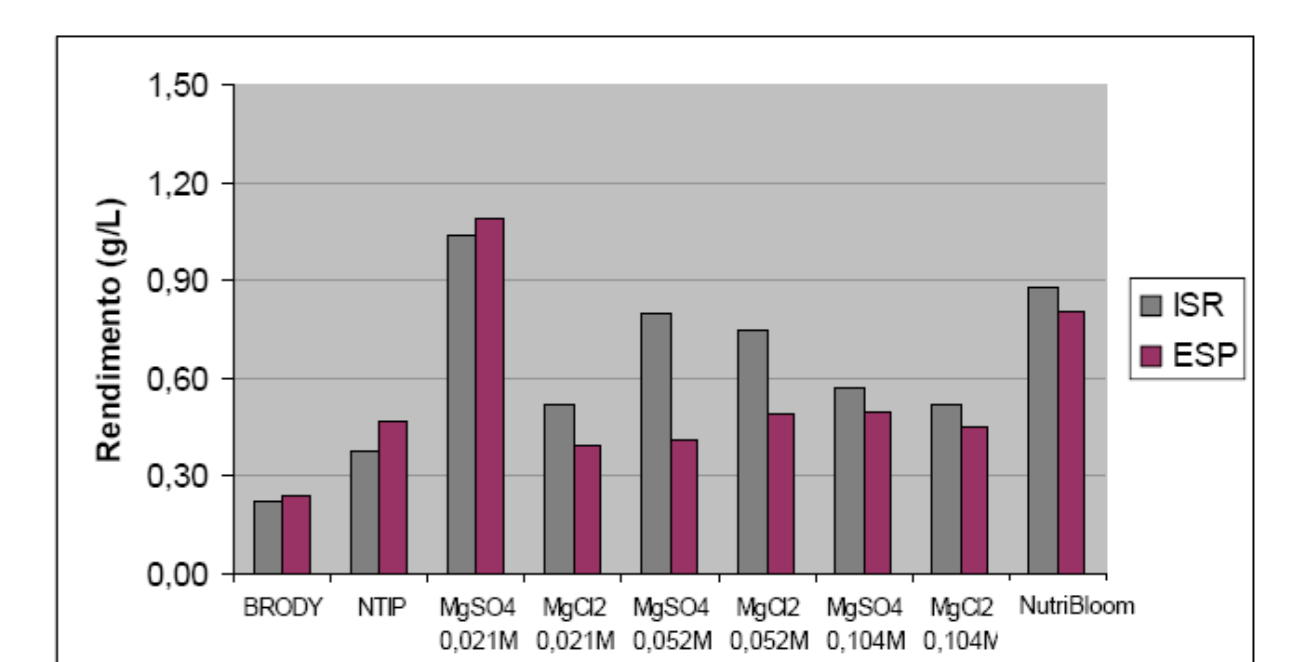


Figura 2. Rendimento de produção de EPS nos meios Brody/NTIP, NTIP enriquecido e NutriBloom

• O conteúdo em açúcares e actividade do EPS

↳ os ésteres sulfatados são, em geral, galactose e glucose sulfatadas

↳ o grau de sulfatação parece ser importante na actividade/ aplicabilidade do EPS

↳ a galactose possui 2 locais susceptíveis de serem sulfatados; a glucose apenas

um;

a percentagem da galactose no EPS de ISR é mais elevada que a de ESP
ENTÃO, a actividade do **EPS de ISR** poderá ser **superior** ao de ESP.

• Realização de estudos *in vitro* sobre a actividade antiviral dos polissacarídeos

↳ Testes de actividade anti-microbiana

↳ Testes de actividade antiviral

	EC50 (µg/mL)				
	<i>H. simplex virus-1</i>	<i>H. simplex virus-2</i>	<i>Vaccinia virus</i>	<i>Vesicular stomatitis virus</i>	<i>H. simplex virus-1 KOS ACV</i>
<i>Porphyridium cruentum</i>	67	11	16	33	78
Brivudin	0,1	175	10	>250	>250
Ribavirin	182	151	88	112	>250

* Virus do Herpes simplex de tipo 1 resistente ao Acyclovir

EC50 – quantidade de substância necessária para reduzir em 50% a citopatogenicidade induzida pelo vírus

A actividade antiviral do EPS é superior a qualquer dos fármacos antivirais, contra todos os tipos de vírus testados, excepto para Brivudin contra *H. simplex t-1*.

Mas tudo depende das células infectadas nos estudos *in vitro*.

NO ENTANTO, a actividade citotóxica para as células HeLa também é superior (100mg para o EPS contra os 250mg dos fármacos)!!
Concentrações superiores a 250mg/ml são também tóxicas para células Vero

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do projecto: Desenvolvimento de Aplicações para Polissacarídeos de *Porphyridium* com Actividade Antiviral (nº ADI/2006/M2.3/0032) e aos Professores S. Arad e J. Fabregas pela cedência das estirpes de *P. cruentum*.

• Formulação galénica para potenciais utilizações como componente stick e gel labial

↳ Critérios para a escolha das formulações:

consistência estável a diferentes temperaturas
uniformidade do filme,
facilidade de aplicação,
cremosidade e adesão

↳ Características do gel

Aspecto: hidrogel ligeiramente translúcido em grande espessura e transparente quando aplicado em camada fina; incolor

Odor: ligeiro, típico do Carbopol
Aplicação: fácil de espalhar e efeito refrescante; com adesividade residual moderada.



	Imagem	Resultados
Stick 1		- Cor branca - Mistura homogênea, com dureza, viscosidade - Chero agradável
Stick 2		- Cor amarela - Mistura homogênea, com dureza, viscosidade - Chero agradável
Stick 6		- Cor amarela - Mistura homogênea, com dureza, viscosidade - Chero agradável
Stick 7		- Cor amarela - Mistura homogênea, com dureza, viscosidade - Chero agradável
Stick 9		- Cor amarela - Mistura homogênea, com dureza, viscosidade - Chero agradável

• Foi efectuado um pedido de **patente nacional**

PARCEIROS NO PROJECTO

↳ Necton (proponente)

↳ UCP-ESB

↳ Bionova (Espanha)