



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102013010819-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102013010819-7

(22) Data do Depósito: 02/05/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2015

(51) Classificação Internacional: A61K 36/05; A61K 31/737; A61P 7/02; A61P 35/00.

(66) Prioridade Interna: BR102012011953-6 de 18/05/2012; BR102012011948-0 de 18/05/2012.

(54) Título: POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE MACROALGAS VERDES MARINHAS COM CAPACIDADE DE MODULAR A NEOVASCULARIZAÇÃO

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, Centro, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80010-200

(72) Inventor: MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA; SILIANE DENISE BERTÉ; MIGUEL DANIEL NOSEDA; PAULINE LAÍS NASATTO; FRANCIANE MARIA PELLIZZARI; JULIANA EMANUELA FOGARI CASSOLATO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 02/05/2013, observadas as condições legais

Expedida em: 09/03/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE MACROALGAS VERDES MARINHAS COM CAPACIDADE DE MODULAR A NEOVASCULARIZAÇÃO

Campo da Invenção

5

A presente invenção é relativa à utilização de polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas verdes, com atividade moduladora da neovascularização *in vivo* inibindo a formação de novos vasos a partir da diferenciação de células endoteliais. Especificamente, trato da utilização desses polissacarídeos na terapia antitumoral de diferentes tipos de cânceres. Adicionalmente, a invenção refere-se ao uso destes polissacarídeos sulfatados como agentes ativos no tratamento de outras doenças dependentes da neovascularização fisiopatológica.

15

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

Há mais de 40 anos, Folkman (1971) propôs o conceito de controle do leito vascular – estimulação ou inibição de novos vasos – como uma alternativa terapêutica para diversas condições clínicas. Em pouco tempo, o controle da angiogênese passou a ser considerado como um dos pontos estratégicos na luta contra o câncer e doenças dependentes da neovascularização, e, inúmeras pesquisas voltaram-se nessa direção. Essas pesquisas desvendaram os principais agentes desse processo e o papel de cada um deles. Graças ao empenho desses pesquisadores, hoje há meios de modular a formação de novos vasos.

25

A formação de novos vasos ocorre, basicamente, por dois processos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é o processo de formação dos primeiros vasos na fase embrionária em animais, já a angiogênese é o processo de obtenção de novos vasos a

partir de vasos já existentes. Apesar da aparente simplicidade, trata-se de processos complexos controlados delicadamente por uma variedade de fatores promotores e inibidores da vascularização. O papel e o mecanismo exato de ação de alguns destes fatores permanece desconhecido, ou apenas parcialmente esclarecido.

De modo geral, o estímulo inicial básico para angiogênese seria uma deficiência no suprimento sanguíneo e redução no aporte de oxigênio às células, causando hipóxia tecidual. A hipóxia é o sinal que deflagra mecanismos intracelulares para aumentar a expressão de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF) e o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF). Ao mesmo tempo, a produção de fatores antiangiogênicos, como a angiostatina, é inibida. Quando os fatores pró-angiogênicos superam os fatores antiangiogênicos, as células endoteliais trocam seu estado quiescente por um estado ativo, transição conhecida como "troca angiogêncica". Tudo indica que o VEGF atua como principal fator pró-angiogênico, desempenhando um papel central nesse processo.

Em humanos, a angiogênese ocorre tanto em situações fisiológicas, como na embriogênese e no processo de reparação tecidual, quanto em situações patológicas. O crescimento tumoral e metastático, a degeneração macular relacionada à idade neovascular, a artrite reumatóide e a retinopatia diabética são, os principais exemplos de doenças, em que a angiogênese é parte fundamental do mecanismo fisiopatológico.

Atualmente, poucas drogas inibidoras angiogênicas estão liberadas pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) para o tratamento de doenças dependentes da neovascularização fisiopatológica. A exemplo disso, o Bevacizumab, princípio ativo do Avastin® - Roche é um anticorpo monoclonal humanizado que,

bloqueia VEGF e é empregado no tratamento de primeira-linha, em pacientes com carcinoma metastático do cólon ou do reto, no câncer de mama, de pulmão e de células renais. No entanto, diversos efeitos colaterais são observados nos pacientes durante e após a administração dessa droga, como por exemplo: maiores taxas de hipertensão arterial, úlceras no estômago e no intestino, perfurações intestinais, e embriotoxicidade. Além disso, em novembro de 2011, a FDA retirou a liberação de Bevacizumab para o tratamento de câncer de mama em estágio avançado, mencionando que, não há comprovação de que o medicamento seja capaz de prolongar a vida dos pacientes com a doença.

Ranibizumab, princípio ativo do Lucentis® - Genentech é um fragmento de anticorpo monoclonal recombinante humanizado, liberado pela FDA para o uso clínico. Este fármaco, um derivado de Bevacizumab é atualmente empregado no tratamento de doenças oculares dependentes da angiogênese fisiopatológica, como a retinopatia diabética e a degeneração macular relacionada a idade neovascular. No entanto, seu uso é dificultado pelo alto custo, além de, ocasionar irritações severas na região ocular do paciente, como por exemplo: sangramento, manchas, inflamações e aumento da pressão ocular.

Neste contexto, é de extrema importância a aplicação de polissacarídeos sulfatados, obtidos de fontes naturais, como fármacos, visto que esses compostos não apresentam nenhum tipo de toxicidade em modelos animais, são naturais e biodegradáveis. Além disso, a produção, obtenção e purificação destes polissacarídeos, são resultantes de etapas simples e de baixo custo.

Importantes atividades biológicas são observadas em estudos com polissacarídeos sulfatados obtidos de fontes não-animal, como por

exemplo: anticoagulante, antioxidante, antiproliferativa, antitumoral, antiinflamatória, antiviral e antiadesiva. A relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados ainda não está claramente estabelecida. No entanto, é provável que

5 algumas disposições estruturais nestes polissacarídeos sejam necessárias para a atividade biológica, especialmente a presença de grupos sulfato, capazes de assegurar interações com proteínas catiônicas. De fato, a importância da massa molecular também deve ser considerada.

Dias e colaboradores (2008) demonstraram que fucanas sulfatadas, obtidas de uma espécie de alga marrom, *Sargassum stenophyllum*, são capazes de inibir a neovascularização através do CAM-assay. No entanto, o rendimento destes polissacarídeos é baixo (aproximadamente 4%) em relação à biomassa algal. Em

10 contrapartida, ramnanas sulfatadas com capacidade de modular a neovascularização, extraídas de macroalgas verdes, podem chegar até

15 50% de rendimento de extração, em relação ao peso seco da alga.

Oligossacarídeos, obtidos através de hidrólise ácida de galactanas extraídas de sementes de uma espécie vegetal, *Lupinus polyphyllus*, demonstraram atividade antiangiogênica em embriões de

20 galinha (Käsbauer *et al.*, 2001). No entanto, além da hidrólise química para obtenção de oligossacarídeos, é necessário sulfatar quimicamente esses oligossacarídeos para que eles, exibam esta capacidade de inibir a angiogênese. Como polissacarídeos extraídos de macroalgas verdes marinhas são sulfatados naturalmente, essa etapa de sulfatação não é

25 necessária.

De modo a contornar estes inconvenientes do tratamento de doenças dependentes da neovascularização, a presente invenção relata, a potente capacidade de inibir a neovascularização por frações polissacarídicas sulfatadas, obtidas de duas espécies de macroalgas

verdes marinhas (*Gayralia brasiliensis* e *Gayralia oxysperma*). Particularmente, esta capacidade foi evidenciada em modelo animal, utilizando embriões de galinha e heparina porcina (HP), com atividade antiproliferativa da vascularização para fins comparativos.

5

Descrição da Abordagem do Problema Técnico

Os tumores sólidos requerem vasos sanguíneos para o seu crescimento, por isso, muitas terapias contra o câncer têm como alvo a vascularização do tumor. Esse tipo de terapia, denominada antiangiogênica, tem a finalidade de, em última instância, privar o tumor de oxigênio e nutrientes, levando-o à morte.

Sendo assim, a presente invenção objetiva, descrever um novo fármaco, polissacarídeo sulfatado, munido da capacidade de modular a neovascularização. É importante destacar, que estes compostos, obtidos de macroalgas verdes marinhas, não foram descritos até o momento, como antiangiogênicos. Esses polissacarídeos poderiam atuar impedindo a nutrição e a oxigenação de células neoplásicas em tumores sólidos, bem como, e a promoção da metástase através da neovascularização fisiopatológica. Desta forma, poderiam também, serem empregados como antiangiogênicos no tratamento de outras doenças decorrentes da neovascularização fisiopatológica.

A obtenção e purificação destes polissacarídeos são etapas simples, de baixo custo e apresentam altos rendimentos. Além disso, vale destacar que estes compostos, obtidos de macroalgas verdes marinhas, não são tóxicos quando aplicados em modelos animais.

Descrição breve dos desenhos

FIGURA - 1: Efeito inibitório das frações polissacarídicas GO (*Gayralia oxysperma*) e GB (*Gayralia brasiliensis*) na vascularização da membrana da vesícula vitelínica (vasculogênese) em embriões de *G. domesticus* com idade de 4 dias. Os controles foram heparina (HP), empregada como controle positivo e discos de metilcelulose contendo apenas água como controle negativo. Os resultados foram expressos como número de vasos sanguíneos que interceptaram o limite do disco de metilcelulose em relação ao número de vasos do controle negativo. Cada barra representa a média + DPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa, ao nível de $p < 0,01$ em relação ao controle negativo (ANOVA, seguida do teste de Tukey). **(A)** 80 $\mu\text{g}/\text{disco}$; **(B)** 160 $\mu\text{g}/\text{disco}$ e **(C)** 320 $\mu\text{g}/\text{disco}$.

15

FIGURA - 2: Fotografias do efeito inibitório de GB na vascularização da membrana da vesícula vitelínica (vasculogênese) em embriões de *G. domesticus* com idade de 4 dias. **(A)** controle negativo; **(B)** 80 $\mu\text{g}/\text{disco}$; **(C)** 160 $\mu\text{g}/\text{disco}$; **(D)** 160 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de HP; **(E)** 320 $\mu\text{g}/\text{disco}$ e **(F)** 480 $\mu\text{g}/\text{disco}$. Barra de 4mm.

20

FIGURA - 3: Efeito inibitório das frações polissacarídicas GO (*Gayralia oxysperma*) e GB (*Gayralia brasiliensis*) na vascularização da membrana corioalantóica (angiogênese) do embrião de galinha (CAM-assay,) com idade de 8 dias. Os controles foram heparina (HP), empregada como controle positivo e discos de metilcelulose contendo apenas água como controle negativo. Os resultados foram expressos como número de vasos sanguíneos que interceptaram o limite do disco de metilcelulose em relação ao número de vasos do controle negativo.

25

Cada barra representa a média + DPM de 8 embriões e os asteriscos denotam diferença estatisticamente significativa, ao nível de $p < 0,01$ em relação ao controle negativo (ANOVA, seguida do teste de Tukey).
(A) 80 µg/disco e **(B)** 320 µg/disco.

5

Descrição detalhada da invenção

(I) - Processamento das algas

10 Algas *Gayralia brasiliensis* e *Gayralia oxysperma* são coletadas em ambiente marinho. As algas primeiramente passam por um pré-tratamento onde são lavadas em água doce para remoção de sais e impurezas residuais, e posteriormente são encaminhadas para retirada do excesso de água. São então congeladas e secas até peso constante. As algas seguem para o processo de moagem, até
15 granulometria final entre 0,1-5 mm.

(II) - Extração dos polissacarídeos

A primeira etapa de extração dos polissacarídeos é realizada a partir da solubilização das algas secas e moídas em água purificada na
20 concentração de 0,1-100 g/L, preferencialmente entre 10 e 40 g/L. Este processo é conduzido sob agitação a temperatura de 10-30 °C, preferencialmente entre 20 e 25 °C, por 2-24 h, preferencialmente entre 10 e 14 h. Após esta etapa o material é centrifugado, ou filtrado, obtendo-se um sobrenadante, ou filtrado, contendo polissacarídeos e
25 um precipitado, ou não-filtrado, contendo a biomassa algal residual. O sobrenadante ou o filtrado devem ter seu volume reduzido, opcionalmente podendo suprimir esta etapa. Os polissacarídeos são então precipitados pela adição de solvente orgânico polar (etanol, metanol, acetona, isopropanol, n-propanol, entre outros),

preferencialmente etanol, em proporção 1:2-5 (v/v), seguido de agitação, repouso sob refrigeração por pelo menos 3 horas e centrifugação. Após centrifugação, o precipitado contendo polissacarídeos é resolubilizado em água purificada. Os polissacarídeos obtidos são então secos (liofilização, estufa a vácuo, spray dryer, entre outros). A biomassa algal residual é resolubilizada com o mesmo volume de água purificada utilizada na primeira etapa de extração dos polissacarídeos, mantida sob agitação preferencialmente à temperatura de 60-100 °C, preferencialmente entre 70 e 90 °C, por um período de 1-10 h, preferencialmente entre 3 e 6 h. Após esta etapa o material é centrifugado, ou filtrado, obtendo-se um sobrenadante, ou filtrado, contendo polissacarídeos e um precipitado, ou não-filtrado, contendo a biomassa algal residual. Os polissacarídeos são então precipitados pela adição de solvente orgânico polar (etanol, metanol, acetona, isopropanol, n-propanol, entre outros) preferencialmente etanol em proporção 1:2-5 (v/v) seguido de agitação, repouso sob refrigeração por pelo menos 3 h e centrifugação. Após centrifugação o precipitado contendo polissacarídeos é resolubilizado em água purificada. Os polissacarídeos obtidos são então secos (liofilização, estufa a vácuo, spray dryer, entre outros). A etapa de extração dos polissacarídeos à temperatura de 60-100 °C pode ser repetida outras vezes para a obtenção de outras frações polissacarídicas semelhantes e conseqüentemente, aumentando assim o rendimento final.

O produto obtido são polissacarídeos sulfatados, compostos principalmente por ramnose, xilose, glucose e ácidos urônicos, além de menores proporções de manose e galactose. Estes polissacarídeos apresentam capacidade de modular a neovascularização em modelos animais.

(III) - Caracterização dos polissacarídeos

Para determinar as características estruturais dos polissacarídeos extraídos de *Gayralia brasiliensis* e *Gayralia oxysperma*, os métodos a seguir são utilizados:

- 5 - Quantificação de carboidratos totais pelo método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956);
- Quantificação de proteínas (Lowry *et al.*, 1951);
- Quantificação de ácidos urônicos pelo método de m-hidroxibifenila (Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991);
- 10 - Quantificação de grupos sulfato pelo método gelatina-bário (Dogson e Price, 1962);
- Determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{25^\circ}$);
- Determinação da composição monossacarídica através de acetato de alditol por CG-SM;
- 15 - Avaliação do perfil de ressonância nuclear magnética de carbono 13 (RMN – ^{13}C).

(IV) – Modulação da vascularização por polissacarídeos sulfatados de *Gayralia brasiliensis* e *Gayralia oxysperma*

- 20 Os polissacarídeos relatados na presente invenção apresentaram atividade, em testes *in vivo*, como inibidores da neovascularização em embriões de galinha nos processos de vasculogênese (avaliado na vascularização da membrana da vesícula vitelínica), de acordo com Dias e colaboradores (2007) e de
- 25 angiogênese na vascularização da membrana corioalantóica (CAM-assay), de acordo com Ribatti e colaboradores (1997).

A presente invenção é abaixo descrita em maiores detalhes mediante aos exemplos, mas não limitada aos mesmos.

Exemplos

5

Exemplo 1 - Extração e Caracterização química dos polissacarídeos de *Gayralia brasiliensis* e *Gayralia oxysperma*

10 As algas *Gayralia brasiliensis* e *Gayralia oxysperma* são coletadas em ambiente marinho na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. As algas passam por um pré-tratamento onde são lavadas uma a uma em água doce para remoção de sais e impurezas residuais, e posteriormente é retirado o excesso de água. Então as algas são congeladas e secas sob sol até peso constante. As algas seguem para o processo de moagem, até atingir granulometria de $\pm 0,5$ mm.

15

A primeira etapa de extração dos polissacarídeos é realizada a partir das algas secas e moídas, com água purificada por destilação preferencialmente na concentração de 20 g/L. Este processo é conduzido sob agitação mecânica na temperatura de 20 °C por 12 h. Após esta etapa o material é centrifugado a 5.000 rpm, 5 °C por 30 minutos obtendo-se um sobrenadante que contém os polissacarídeos e um precipitado que contém a biomassa algal residual. O sobrenadante é concentrado em rotaevaporador até aproximadamente 1/5 do volume inicial. Os polissacarídeos são então precipitados pela adição de solvente orgânico polar, etanol, em proporção 1:3 (v/v) seguido de agitação, repouso sob refrigeração por pelo menos 12 h e centrifugação a 5.000 rpm, 5 °C por 30 min. Após centrifugação o precipitado contendo polissacarídeos é ressolubilizado em água purificada. Após os polissacarídeos são congelados e secos por liofilização. A biomassa algal residual é ressolubilizada com o mesmo

20

25

volume de água purificada utilizada na primeira etapa de extração dos polissacarídeos, mantida sob agitação mecânica na temperatura de 80 °C por um período de 4 h. Após esta etapa o material é centrifugado a 5.000 rpm, 5 °C por 30 min obtendo-se um sobrenadante que contém os polissacarídeos e um precipitado que contém a biomassa algal residual.

5 O sobrenadante é concentrado em rotaevaporador até aproximadamente 1/5 do volume inicial. Os polissacarídeos são então precipitados pela adição de solvente orgânico polar, etanol, em proporção 1:3 (v/v) seguido de agitação, repouso sob refrigeração por

10 pelo menos 12 h e centrifugação a 5.000 rpm, 5 °C por 30 min. Após centrifugação o precipitado contendo polissacarídeos é resolubilizado em água purificada. Após os polissacarídeos são congelados e secos por liofilização. A etapa de extração dos polissacarídeos a temperatura de 80 °C é repetida por mais duas vezes para a obtenção de outras

15 frações polissacarídicas.

Os polissacarídeos resultantes das etapas de extração descritas anteriormente são reunidos e apresentados na Tabela 1 de caracterização química, sendo a fração polissacarídica GB de *Gayralia brasiliensis* e a fração GO de *Gayralia oxysperma*.

20 Análises de RMN de ¹³C das frações GB e GO resultam em espectros similares e complexos. Caracterizados por sinais alargados e sobrepostos, devido a diferentes ligações glicosídicas, grupos sulfatos ligados a unidades de ramnose e variedade de unidades monossacarídicas presentes na composição desses polissacarídeos.

25 De forma geral, os espectros de RMN de ¹³C dos polissacarídeos sulfatados presentes nas frações GB e GO, apresentam três principais regiões. A região de 17,8-18,2 ppm com sinal intenso, e bastante característico, referente ao C-6 de unidades de ramnose. A região anomérica com sinais em 97,5-106,0 ppm, referente aos carbonos

anoméricos das unidades monossacarídicas presentes no polissacarídeo, principalmente de ramnose. Uma região bastante complexa em 60,0-85,0 ppm correspondente ao sinais dos demais carbonos do anel das unidades monossacarídicas.

5

Tabela 1 – Composição química dos polissacarídeos sulfatados presentes nas frações GB e GO, isoladas das macroalgas verdes marinhas *Gayralia brasiliensis* e *Gayralia oxysperma*, respectivamente.

Componente	Fração GB	Fração GO
Sulfato (%)	29,4	26
Proteína (%)	3,5	3,9
Ácidos urônicos (%)	8,6	17
Carboidratos Totais (%)	65,8	49,6
Monossacarídeos neutros (mol%)		
Ramnose	68,4	65,9
Xilose	12,1	10,2
Glucose	15,1	10,5
Galactose	2,1	6,2
Manose	2,3	1,8
$[\alpha]_D^{25^\circ}$	-41,4	-38

10

Exemplo 2 – Vasculogênese na membrana da vesícula vitelínica de embriões de galinha

Devido à utilização de animais como modelos biológicos no desenvolvimento dos ensaios descritos a seguir, um projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA-UFPR) e aprovado sob o número 23075.098873/2011-37 (Aprovado: 04/11/2011 – R.O. 10/2011).

15

Modelo Biológico – Ovos de galinha da espécie *Gallus domesticus*, de tamanho padrão médio (aproximadamente 55 g),

fertilizados e livres de patógenos específicos, em um período de até 12 h após a postura foram utilizados como modelo biológico para os ensaios de vasculogênese e angiogênese na presente invenção. Esse material pode ser estocado a uma temperatura de 18-22° C, por até no máximo 5 48 horas, até o início da incubação.

Para avaliar a capacidade inibitória das frações GB e GO sob a formação de vasos sanguíneos foi realizado inicialmente, o ensaio da membrana da vesícula vitelínica (MVV) do embrião de galinha. Este método é adaptado do ensaio da membrana corioalantóica (CAM-10 Assay).

Os tratamentos ($n = 8$) foram realizados por meio de suportes de metilcelulose em forma de disco (2 mm de diâmetro, 1 disco/embrião). Os polissacarídeos sulfatados presentes nas frações GB e GO foram absorvidos em metilcelulose, considerando-se os diferentes valores de 15 concentração (1-600 $\mu\text{g}/\text{disco}$). Uma solução de metilcelulose a 0,5 % com as diferentes concentrações dos polissacarídeos foi seca em câmara de fluxo laminar, sobre superfície antiaderente de politetrafluoroetileno. Para preparar o disco de metilcelulose com o polissacarídeo, 5 μL foram pipetados para cada disco. Como controle 20 negativo foi utilizado discos de metilcelulose contendo apenas água destilada. Discos de metilcelulose contendo heparina (HP) (1-400 $\mu\text{g}/\text{disco}$) foram utilizados como controle positivo.

Ovos de galinha foram previamente mantidos em estufa incubadora equipada com ventilação forçada, umidade aproximada 25 de 35 % e temperatura de 37,5 °C, por um período de 48 h. Uma abertura de aproximadamente 10 mm foi feita na casca do ovo com auxílio de tesoura e os discos contendo os polissacarídeos foram implantados na mesma região para todos os tratamentos. A seguir, as aberturas foram fechadas com a própria parte da casca do ovo

removida e vedadas com fita adesiva. Os ovos foram reintroduzidos na incubadora por mais 48 h, até a idade embrionária de quatro dias. A zona circunvizinha ao disco de metilcelulose foi analisada quanto ao número de vasos sanguíneos com o auxílio de microscópio estereoscópico. A quantificação dos vasos sanguíneos da MVV, que interceptaram o limite do disco de metilcelulose, foi expressa em relação ao número de vasos do controle negativo. Embriões não viáveis foram descartados.

Para facilitar a avaliação da vasculogênese através da contagem de vasos sanguíneos, discos de papel filtro de tamanho igual aos discos de metilcelulose foram posicionados exatamente sobre a superfície onde foram depositados os implantes de metilcelulose.

Todos os resultados foram expressos como média de 8 experimentos e desvio padrão da média comparados através da análise de variância (ANOVA). Em seguida, foi realizado o teste de Tukey para análise dos desvios, sendo que os valores de $p < 0,01$ considerados estatisticamente significativos. Para essas análises e para confecção dos gráficos, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

A Figura 1 demonstra a capacidade antivasculogênica das frações GO, GB e HP nas concentrações de 80 μg (A), 160 μg (B) e 320 μg (C). Enquanto que, a MVV tratada apenas com o controle negativo (água) apresentou 86 vasos, quando se aplicou GB (80 μg), houve diminuição significativa da vascularização em 33 % (58 vasos). A fração GO não foi tão efetiva quanto GB, mas também inibiu a vasculogênese significativamente em 18 % (70 vasos). Na mesma concentração, HP inibiu 61 % dos vasos sanguíneos.

Na Figura 1-B pode se notar que GB, na concentração de 160 μg , foi efetiva na MVV inibindo 59 % dos vasos. Esse efeito é similar ao da

HP quando se utilizou a concentração de 80 µg desta fração (Figura 1-A).

Na concentração de 320 µg das frações GB e GO houve 94 % e 79 % e de inibição dos vasos, respectivamente (Figura 1-C). Em dados não demonstrados, foi observado que quando se aplicou concentrações maiores de 320 µg das frações GB e GO houve inibição de 100 % dos vasos da membrana da vesícula vitelínica.

As fotografias, demonstradas na Figura 2, ilustram a membrana da vesícula vitelínica do embrião de galinha tratadas com a fração GB, obtida de *Gayralia brasiliensis*, 48 h após os tratamentos, exceto a imagem B, que foi tratada com HP. Uma inibição da vascularização é observada com o aumento da concentração de GB e, na concentração de 480 µg dessa mesma fração, pode se visualizar a ausência total dos vasos sanguíneos.

Não houve diferença significativa entre as frações GB e GO, em todas as concentrações avaliadas na presente invenção.

Exemplo 3 – Angiogênese na membrana corioalantóica de embriões de galinha

Para avaliação do processo de angiogênese, foi realizado o ensaio *in vivo* da membrana corioalantóica (CAM-assay). O modelo biológico, os procedimentos de incubação preliminar, o preparo dos discos de metilcelulose com os tratamentos e a abertura dos ovos, foram realizados de acordo com o descrito para os ensaios de vasculogênese no Exemplo 2.

No terceiro dia de incubação, cerca de 3 mL de albumina do ovo foram aspirados com auxílio de seringa, para separar a membrana corioalantóica em desenvolvimento da casca e evitar a aderência do embrião nas membranas ovulares. Estas pequenas aberturas foram

ocluídas com fita adesiva e os ovos re-incubados até o sexto dia (dia embrionário E6; estágio 28/29HH). Neste estágio, foram implantados os discos de metilcelulose com os diferentes tratamentos sobre os vasos sanguíneos, no terço externo da membrana corioalantóica.

5 Imediatamente após os tratamentos, as aberturas na casca foram vedadas com a parte da casca do ovo removida e fita adesiva, então, reinsertos na incubadora (37,5 °C; 48 h). A seguir, os ovos foram retirados da estufa e a região contígua ao disco de metilcelulose foi examinada com auxílio de microscópio estereoscópico a fim de
10 observar os vasos. A inibição da angiogênese foi determinada considerando-se a redução do número de vasos que interceptaram o disco de metilcelulose (aspecto de uma zona avascular), sendo os valores expressos em relação ao número de vasos do controle negativo (discos de metilcelulose e água).

15 Para facilitar a avaliação da angiogênese através da contagem de vasos sanguíneos, discos de papel filtro de tamanho igual aos discos de metilcelulose foram posicionados exatamente sobre a superfície onde foram depositados os implantes de metilcelulose.

 Todos os resultados foram expressos como média de 8
20 experimentos e desvio padrão da média comparados através da análise de variância (ANOVA). Em seguida, foi realizado o teste de Tukey para análise dos desvios, sendo que os valores de $p < 0,01$ considerados estatisticamente significativos. Para essas análises e para confecção dos gráficos, foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

25 Os gráficos A e B, contidos na Figura 3, demonstram a atividade antiangiogênica das frações GB, GO e HP. Concentrações de GB e GO superiores à 320 µg inibiram 100 % da vascularização da membrana corioalantóica. Ao contrário dos resultados observados no ensaio de vasculogênese, no ensaio de angiogênese, quando se utilizou a

concentração 320 µg, a fração GO foi mais efetiva que a fração GB. No entanto, GB inibiu significativamente a vascularização na membrana corioalantóica em relação ao controle negativo. Desta forma, as duas frações polissacarídicas apresentadas nesta invenção são potenciais

5 como fármacos antiangiogênicos.

REIVINDICAÇÕES

1. Composições farmacêuticas **caracterizadas** pelo fato de compreender polissacarídeos sulfatados apresentando os seguintes teores:

- entre 1-60% de grupos sulfato;
- entre 1-30% de ácidos urônicos;
- entre 1-95% de ramnose;
- entre 0-40% de glucose;
- entre 0-40% de xilose;
- entre 0-30% de manose;
- entre 0-30% de galactose.
- veículos farmacêuticamente aceitáveis.

2. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas** pelo fato dos polissacarídeos sulfatados serem extraídos de macro algas verdes marinhas.

3. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizadas** pelo fato das macroalgas verdes pertencerem à divisão *Chlorophyta*, à família *Ulvales*, e ao gênero *Gayralia*.

4. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizadas** pelo fato do gênero *Gayralia* compreender as espécies *Gayralia brasiliensis* e *Gayralia oxysperma*.

5. Composições farmacêuticas, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizadas** pelo fato dos polissacarídeos sulfatados serem obtidos em sua forma bruta após processo de purificação ou modificação química.

6. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizadas** pelo fato da purificação ser selecionada do grupo consistindo principalmente em ultrafiltração, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular.

7. Composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizadas** pelo fato da modificação química ser

selecionada do grupo consistindo principalmente em sulfatação, hidrólise ácida, hidrólise enzimática e carboxiredução.

8. Uso das composições farmacêuticas conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para tratar ou prevenir uma desordem associada com vascularização fisiopatológica em humanos.

9. Uso das composições farmacêuticas conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para modular a vascularização ou neovascularização em humanos.

10. Uso das composições farmacêuticas conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para tratar doenças neoplásicas, dependentes da vasculogênese e dependentes da angiogênese da neovascularização fisiopatológica.

11. Uso das composições farmacêuticas, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato da neovascularização fisiopatológica incluir retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade neovascular, neovascularização de córnea transplantada, glaucoma neovascular, tracoma, fibroplasia retrolental, psoríase, glaucoma piogênico, desenvolvimento de placa aterosclerótica, hemangioma, angiofibroma, malformações artero-venosas e artrite.

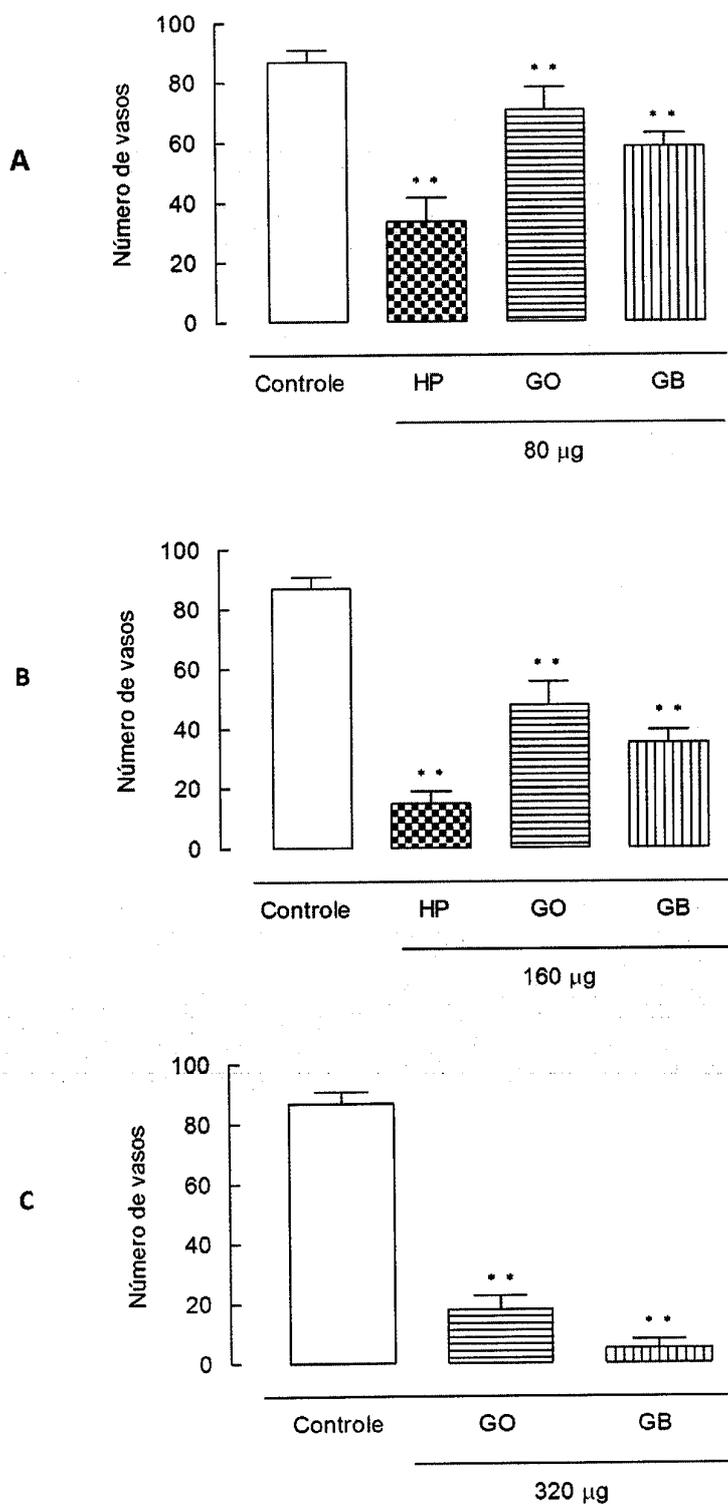
DESENHOS**FIGURA - 1**

FIGURA - 2

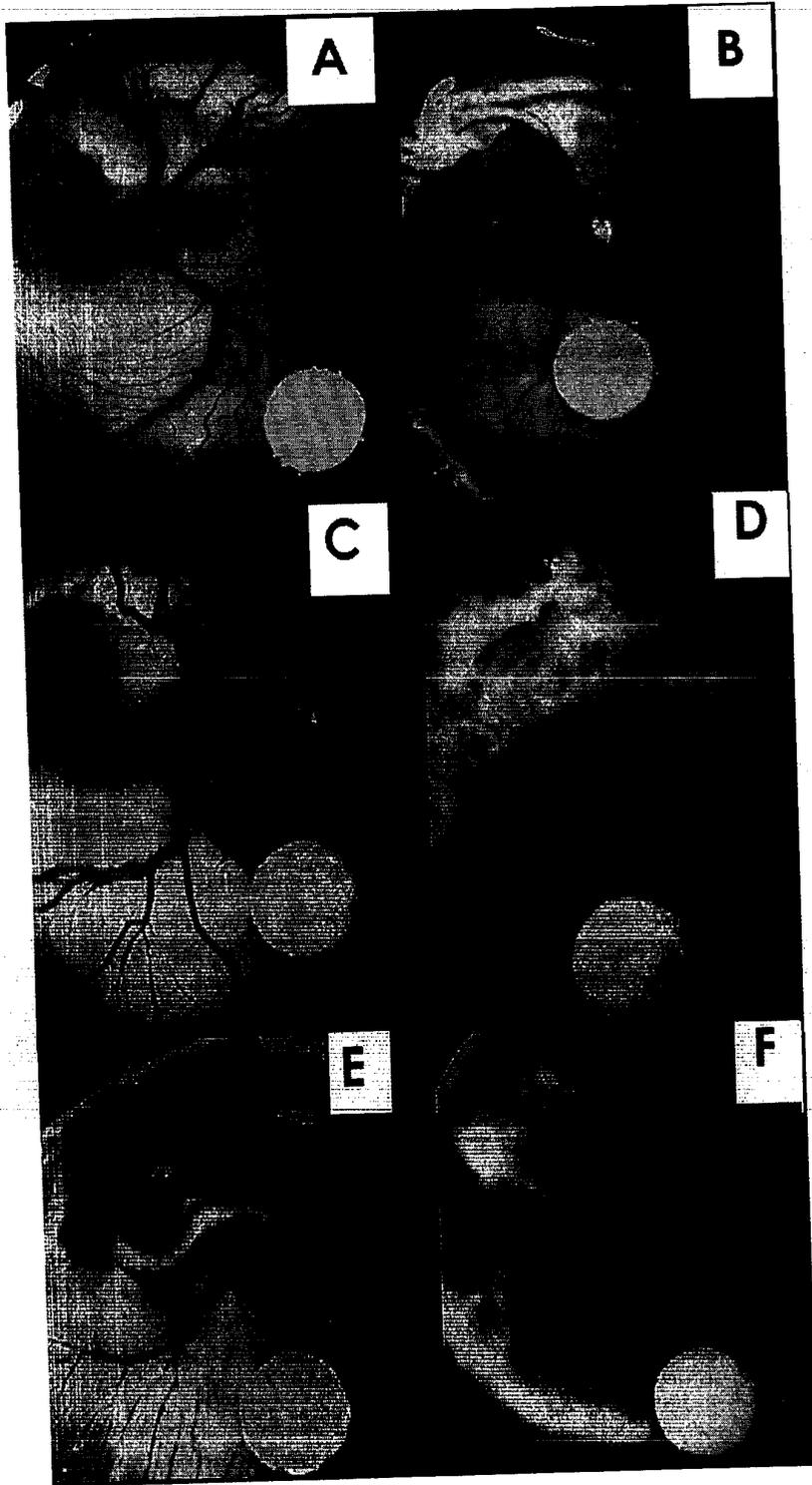


FIGURA - 3

